

Untersuchungen über die Veränderungen
der quantitativen Zusammensetzung der Pigmente
von *Fusarium aquaeductuum* im Verlauf
ihrer Entstehung

Ursula Böhme

1962

Untersuchungen über die Veränderungen der
quantitativen Zusammensetzung der Pigmen-
te von Fusarium aquaeductuum im Verlauf
ihrer Entstehung

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwigs-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Ursula Böhme
aus
Rothenburg ob der Tauber

November 1962



1. Berichterstatter: Professor Dr. Leo Brauner
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Merxmüller

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.1962

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methodik	
a) Allgemeines	9
b) Quantitative Bestimmung der einzelnen Farbstoffkomponenten mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie	12
III. Ergebnisse	
1. Identifizierung der einzelnen Farbstoffzonen	17
2. Bildungsverlauf der einzelnen Komponenten des Carotinoidgemisches	22
3. Einfluß der Lichtintensität auf die Zusammensetzung des Carotinoidgemisches	28
4. Einfluß von Glukosefütterung auf die Zusammensetzung des Pigmentgemisches	32
5. Einfluß von Methylenblau auf die Zusammensetzung des Carotinoidgemisches	39
IV. Diskussion	51
V. Zusammenfassung	57
VI. Literatur	59



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555208_0094

I. Einleitung

Die Färbung von *Fusarium aquaeductuum* beruht nach Untersuchungen von RAU und ZEHENDER (1959) auf dem Gehalt an verschiedenen Carotinoiden.

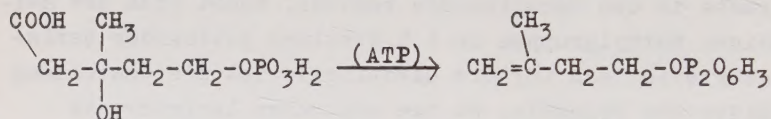
Die Carotinoide sind eine im Pflanzenreich weit verbreitete Stoffgruppe; sie weisen alle dasselbe Bauprinzip auf: ihre Struktur entspricht der Isoprenregel; damit stehen diese Pigmente in enger Beziehung zu den Terpenen (z.B. Kautschuk, Cholestrin u.s.w.). Mit einer Ausnahme ist die Anordnung der Isoprenreste in den Carotinoiden regulär, wobei sich die seitenständigen Methylgruppen in 1,5 Stellung zueinander befinden. Charakteristisch für die Carotinoide ist die Umstellung in der Mitte des Moleküls, wo die zentralen Isoprenreste so zusammengelagert sind, daß die Methylgruppen hier 1,6 ständig sind. Die Carotinoidfarbstoffe sind z.T. rein aliphatische Verbindungen mit offener Kohlenstoffkette, z.T. enthalten die Moleküle einen oder zwei endständige sechsgliedrige Ringe. Der Farbstoffcharakter dieser Verbindungen beruht auf einem System zahlreicher konjugierter Doppelbindungen.

Die Aufklärung der Biosynthese der Carotinoide wurde vor allem in den letzten Jahren sehr weit vorangetrieben. Durch die Arbeiten von GROB (1956, 1958, 1959, 1961), LYNEN (1958, 1961), GOODWIN (1951, 1952, 1956, 1961) und anderen konnte der im folgenden beschriebene Syntheseweg sehr wahrscheinlich gemacht, wenn auch noch nicht in allen Einzelheiten bewiesen werden.

GROB und BÜTLER (1956) stellten durch Untersuchungen an den Schimmelpilzen *Phycomyces blakesleeana* und *Mucor hiemalis* fest, daß die Essigsäure in aktiver Form als Azetyl-Coenzym A die erste Vorstufe der Carotinoidbildung ist. Geht die Carotinoidbildung von Kohlenhydraten (z.B. Glukose) aus, so wird

die intermediär auftretende Brenztraubensäure in Citronensäure übergeführt, wobei letztere durch Mitwirkung von Coenzym A Azetyl-Coenzym A abspaltet. Damit erscheint das Azetyl-Coenzym A als Ausgangspunkt der Carotinoidsynthese im lebenden Organismus.

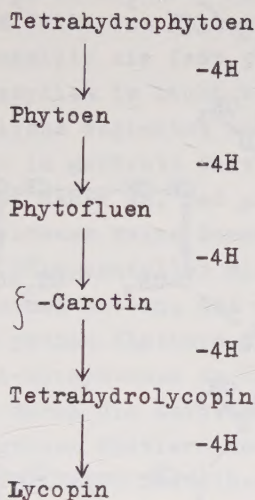
Nach LYNEN (1958) wird aus 3 Molekülen Azetyl-Coenzym A Mevalonsäure gebildet; diese wird mit Hilfe von ATP zu 5-Phosphor-Mevalonsäure phosphoryliert. Noch sehr unklar sind die Reaktionen, durch welche letztere mit ATP unter Dehydratisierung und Decarboxylierung Isopentenyl-Pyrophosphat, das "aktive Isopren" liefert.



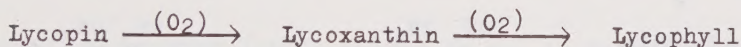
Durch Zusammenlagerung von 2 Isopentenylpyrophosphat-Molekülen entsteht zunächst das Geranyl-pyrophosphat, das dann mit einem dritten Molekül Farnesyl-pyrophosphat und mit einem weiteren Isopentenylpyrophosphat das Geranyl-geraniol-pyrophosphat, einen C_{20} -Körper bildet. 1961 gelang GROB, KIRSCHNER und LYNEN der Beweis, daß *Neurospora crassa* ein Enzymsystem besitzt, das in der Lage ist Geranyl-geraniol-pyrophosphat zu Lycopersen zu dimerisieren.

GROB (1957) konnte zeigen, daß 2-C^{14} Mevalonsäure in die Carotinoide von *Neurospora* eingebaut wird; dasselbe fanden GOODWIN (1957) bei *Phycomyces blakesleeana* und SUZUE (1961) bei *Staphylococcus aureus*. MODI und PATWA (1961) gelang es mit zellfreien Extrakten von Karotten aus Acetat, Glukose und Mevalonat Carotinoide aufzubauen. Schon nach seinen früheren Versuchen hatte GROB vermutet, daß als erste C_{40} -Carotinidvorstufe Lycopersen gebildet wird. Es konnte auch tatsächlich in *Neurospora crassa* nachgewiesen werden, seine Rolle in der Biosynthese der Carotinoide ist allerdings noch nicht geklärt.

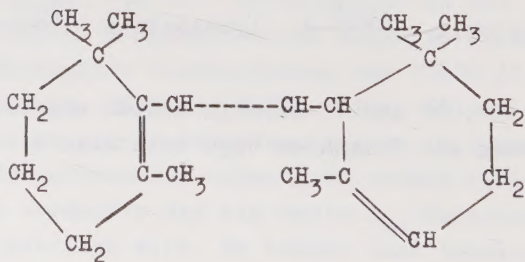
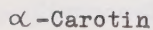
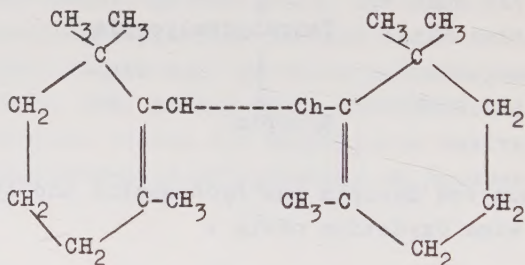
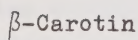
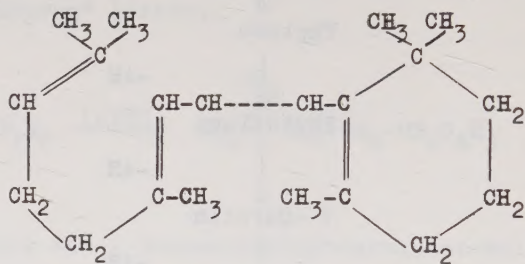
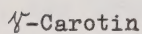
PORTER und LINCOLN (1950) stellten auf Grund von Versuchen mit Tomaten als erste ein Schema für die Carotinoidsynthese auf. Sie gingen davon aus, daß Tetrahydrophytoen, Phytoen, Phytofluen, { -Carotin, Tetrahydrolycopin und Lycopin eine Reihe bilden, in der sich die einzelnen Polyene nur durch die Zahl der konjugierten Doppelbindungen im Molekül unterscheiden; sie könnten deshalb durch Reduktion oder Dehydrierung auseinander gebildet werden.



Um nun vom Lycopin zum Lycoxanthin und Lycophyll zu gelangen, ist eine Oxydation nötig :



Das α -, β - und γ -Carotin müßten aus dem Lycopin durch Ringbildung auf folgendem Wege entstehen :



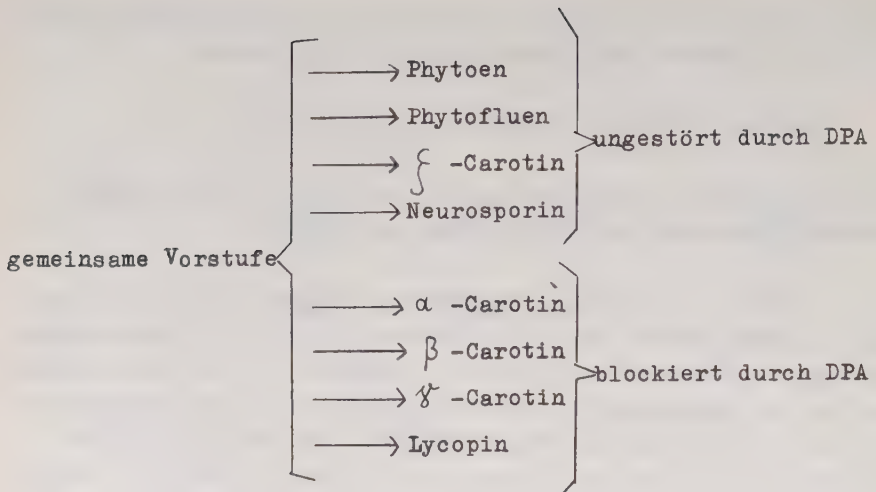
Das $\int$ -Carotin wird dagegen wahrscheinlich von Tetrahydrolycopin durch Dehydrierung und Ringschluß abgeleitet :



3 Reaktionstypen charakterisieren also das PORTER-LINCOLN-Schema: Dehydrierung, Ringbildung und Oxydation.

CLAES (1957) konnte bei der Grünalge *Chlorella* alle Glieder der PORTER-LINCOLN Reihe vom Phytoen bis zum Prolycopin nachweisen. Außerdem stellte sie fest, daß die Bildung von Carotinoiden und Xanthophyllen im Licht stets von einer Abnahme der Porter-Lincoln-Polyene begleitet war, ein Beweis, daß die letzteren im Licht in gefärbte Carotinoide umgewandelt werden können. CLAES nimmt daher an, daß grüne Pflanzengewebe in ihrer Carotinoidsynthese keine Sonderstellung gegenüber chlorophyllfreien Pflanzenteilen einnehmen. Während PORTER und LINCOLN angenommen hatten, daß das Fehlen von Phytoen und Phytofluoren in grünen Blättern auf einen anderen Mechanismus der Carotinoid-Biosynthese in Chloroplasten hinweist, konnte ENY (1953) durch die Entdeckung dieser beiden farblosen Polyene in grünen Blättern und im Milchsaft von *Hevea brasiliensis* das Vorliegen desselben Reaktionsschemas für Chloroplasten wahrscheinlich machen. Eine weitere Bestätigung dieser Annahme ergab sich aus dem Nachweis des Tetrahydrolycopins in grünen Blättern durch ZECHMEISTER und SANDOVAL (1945 zit. bei ENY, 1953).

GOODWIN und LIJNSKY (1951) halten es nun im Gegensatz zu den bisher angeführten Hypothesen nicht für wahrscheinlich, daß Lycopin die erste gefärbte Stufe in der Biosynthese ist und die mehr ungesättigten Polyene aus dieser durch Reduktion gebildet werden. Nach Experimenten mit Diphenylamin (DPA), einem spezifischen Hemmstoff der Carotinoidsynthese bei *Phycomyces* nehmen GOODWIN und LIJNSKY (1951) statt einer stufenweisen Bildung eines Carotinoids aus dem anderen eine parallele Synthese der Polyenreihe aus einer gemeinsamen Vorstufe an :



Bei Blockierung der Synthese ungesättigter Polyene durch DPA würde nach ihrer Ansicht mehr von der gemeinsamen Vorstufe für die Synthese der gesättigteren Derivate zur Verfügung stehen und sich diese deshalb im Mycel anhäufen.

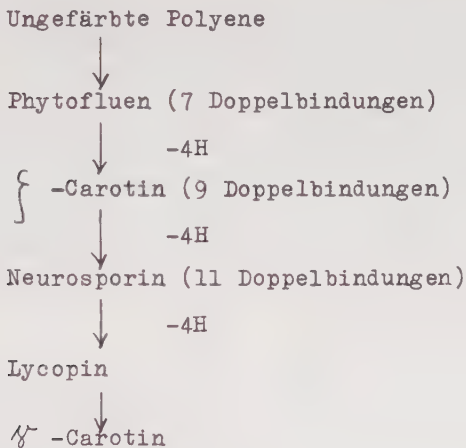
Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte VILLOUTREIX (1960) bei Untersuchungen an *Rhodotorula mucilaginosa*. Er zog ebenfalls den Schluß, daß zumindest einige Mikroorganismen eine Carotinoidsynthese haben, die nicht nach dem Porter-Lincoln-Schema verläuft, sondern daß eine unabhängige Synthese der einzelnen Carotinoide aus einer gemeinsamen Vorstufe erfolgt.

Bei den meisten Mikroorganismen verläuft die Carotinoidbildung unabhängig vom Licht. Nur bei wenigen konnte festgestellt werden, daß Licht die Carotinoidsynthese fördert oder sogar dafür unbedingt notwendig ist.

Über den Mechanismus der Lichtwirkung ist noch wenig bekannt. ZALOKAR (1954, 1955) fand an konidienfreien Kulturen von *Neurospora crassa*, daß schon eine Belichtung von 1 Min. ausreicht, um in anschließender Dunkelheit Farbstoffbildung anzuregen. Die Synthese der Farbstoffe verläuft demnach in mindestens 2 Schritten: einer lichtabhängigen Primärreaktion und

einer Sekundärreaktion, in der dann unabhängig vom Licht auch im Dunkeln erst die Pigmente gebildet werden. Dasselbe fanden GROB (1958) ebenfalls bei *Neurospora crassa* und RAU und ZEHENDER (1961) bei *Fusarium aquaeductuum*. An welcher Stelle des Synthesewegs nun das Licht eingreift, ist ebenfalls noch weitgehend unbekannt.

GROB (1958) stellte bei Untersuchungen an *Neurospora crassa* fest, daß schon eine kurze Belichtungszeit genügt, um eine Pigmentierung hervorzurufen. Er schloß aus dem raschen Ablauf der Farbstoffbildung, daß weitgehend vorgebildete Vorstufen in den Dunkelkulturen vorliegen. GROB ordnete die Carotinoide von *Neurospora crassa* in der Reihenfolge ihrer Entstehung und erhielt folgendes Schema :



Ebenfalls an *Neurospora crassa* wiesen HAXO (1949) und ZALOKAR (1957) in Dunkelkulturen reichliche Mengen Phytoen nach, dessen Konzentration mit zunehmender Bildung der Carotinoide rasch abfiel. HAXO betrachtet danach das Phytoen als Vorstufe der Carotinoide. ZALOKAR (1957) konnte dagegen feststellen, daß die Abnahme des Phytoens nicht mit der Bildung eines be-

stimmten Carotinoids in Beziehung zu setzen ist. Die Menge des gebildeten Pigments übertraf in allen Fällen die des verbrauchten Phytoens; dies zeigt aber, daß das vorhandene Phytoen, wenn überhaupt, dann nur teilweise eine Quelle der gefärbten Polyene ist. Schon 1954 hatte ZALOKAR eine unabhängige Bildung von Phytoen, Phytofluen und gefärbten Polyenen gefunden. Er konnte außerdem zeigen, daß die 3 gefärbten Glieder der Porter-Lincoln-Reihe, β -Carotin, Neurospirin und Lycopin gleichzeitig in etwa gleicher Menge auftreten, was aber nicht der Fall sein dürfte, wenn man, wie Porter und Lincoln, sich ein Carotinoid aus dem anderen entstanden denkt. Aus diesen Gründen ist auch ZALOKAR der Ansicht, daß die Carotinoide aus einer gemeinsamen Vorstufe entstehen.

Auch die Wirkung des Substrats auf die Carotinoidsynthese wurde bereits mehrfach untersucht. MASE (1959) hält die Menge an assimilierbarem Kohlenstoff für den begrenzenden Faktor bei der Carotinoidbildung; das C:N Verhältnis hat dabei nur eine untergeordnete Bedeutung. Ist Stickstoff im Überschuß vorhanden, so wird der Kohlenstoff vor allem zur Proteinsynthese verwendet, sodaß für die Carotinoidbildung nur wenig übrig bleibt. Ist dagegen Kohlenstoff im Überschuß vorhanden, so reicht er auch noch für die Carotinoidsynthese aus.

Auch GARTON, GOODWIN und LIJNSKY (1951) fanden bei Versuchen an *Phycomyces blakesleeana*, daß das C:N Verhältnis die Carotinoidsynthese nicht beeinflußt. Für maximales Wachstum ist zwar genügend verwertbarer Stickstoff notwendig, die Produktion von β -Carotin erreicht aber erst ein größeres Ausmaß, wenn die Glukose-Konzentration einen bestimmten Betrag überschreitet. SCHOPFER (1943, zit. bei GOODWIN et.al. 1951) hält dagegen das C:N Verhältnis für den wichtigsten Faktor bei der Carotinoidsynthese von *Phycomyces*, ebenso CHODAT (1938, zit. bei GOODWIN et. al. 1951) für Algen.

GOODWIN (1952) und CARLILE (1956) geben an, daß die Pigmentsynthese erst einsetzt, wenn das Mycelwachstum größtenteils beendet ist.

Welche Kohlenstoffquelle am wirksamsten für die Carotinoidbildung ist, scheint weitgehend artspezifisch zu sein; neben Glukose und anderen Hexosen förderten z.T. auch Pentosen und Glycerin die Pigmentsynthese (INGRAHAM und STEENBOCK, 1935, zit. bei GOODWIN und JAMIKORN 1956, FROMAGEOT und TSCHANG, 1938, GOODWIN und JAMIKORN, 1956).

Wie schon erwähnt, bildet *Fusarium aquaeductuum* ebenfalls nur im Licht Carotinoide und zwar als Hauptpigmente Lycopin, γ -Carotin und Neurosporaxanthin; daneben kommen noch Rhodoxanthin, Neolycopin, Polycislycopin II und 2 nicht identifizierte Pigmente vor. (RAU und ZEHENDER, 1959). In der vorliegenden Arbeit sollte nun an diesem Pilz untersucht werden, in welcher Reihenfolge die einzelnen Pigmente nach der Belichtung gebildet werden, um damit möglicherweise ein Bild vom Reaktionsweg der letzten Phase der Biosynthese der Carotinoide zu gewinnen. Weiterhin sollte der Einfluß verschiedener Kulturbedingungen auf die Zusammensetzung der Pigmente geprüft werden.

II. Material und Methodik

a) Allgemeines.

Als Material für die Versuche diente der bereits bei früheren Untersuchungen verwendete Stamm von *Fusarium aquaeductuum* (RAU und ZEHENDER, 1959). Die Anzucht des Pilzes erfolgte durch Überimpfen von Reinkulturen in Erlenmeyerkolben mit 400 ml 3%iger Malzextraktlösung (pH 5,6). In dieser Nährlösung wurde der Pilz 2 1/2 Tage bei 22°C und völliger Dunkelheit

auf der Schüttelmaschine kultiviert. Nach Vorversuchen liefert der Pilz in diesem Alter bei Belichtung die größte Ausbeute an Farbstoffen. Die Pilzsuspension wurde über einen Büchnertrichter aus der Nährlösung abfiltriert, gründlich mit destilliertem Wasser ausgewaschen und anschließend in Phosphatpuffer ($1/80$ mol, pH 5,6) suspendiert. Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden 5 ml der Pilzsuspension in Wägegläschen 24 Std. bei 105°C und anschließend im Exsikkator über CaCl_2 getrocknet. Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach Kjeldal.

Je 150 ml dieser Pilzsuspension wurden in Gaswaschflaschen gefüllt und unter ständigem Durchströmen von Luft zur Farbstoffbildung dem Licht ausgesetzt. Belichtet wurden die Proben mit 3 Leuchtstoffröhren (Osram, Lichtfarbe 15, 65 Watt) in einer Klimakammer (20°C). Die Lichtintensität betrug, wenn nicht anders angegeben, 16 000 Lux (gemessen mit einem geeichten Luxmeter der Fa. Lange, Berlin).

Nach bestimmten Belichtungszeiten wurde das gefärbte Pilzmycel wieder aus dem Phosphatpuffer abfiltriert und daraus die Farbstoffe mit Hilfe eines Homogenisators nach Potter und Elvehjem mit Aceton extrahiert, wobei jede Probe mehrmals mit Aceton unter Zugabe einiger Tropfen Eisessig und einer Spatelspitze Ammonsulfat homogenisiert wurde; nachdem sich nach kurzer Zeit das zerkleinerte Mycel abgesetzt hatte, konnten die im überstehenden Aceton gelösten Farbstoffe in einen Scheidetrichter abgegossen, der Niederschlag durch eine Glasfilternutsche (G 4) geschickt und mehrmals mit Aceton, dem einige Tropfen Eisessig zugesetzt waren, nachgewaschen werden. Übrig blieb ein völlig farbloser Rückstand. Die in Aceton gelösten Farbstoffe wurden durch Zugabe von 10%iger Ammonsulfatlösung und Petroläther in letzteren übergetrieben, dann mehrmals mit aqua dest. gewaschen und der Extrakt anschließend in einem Vakuum-Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft. Die so gewonnenen Farbstoffe (im folgenden als

"Gesamtfarbstoff" bezeichnet) wurden mit einer bestimmten Menge Petroläther (Sp. 30-50°C) aufgenommen und ihre Extinktion in 10 mm Küvetten in einem Beckmann Spektralphotometer (Modell B) zwischen 455 und 485 m μ im Abstand von 5 bzw. 2,5 m μ gemessen. Die Farbstoffmenge ist in allen Abbildungen und Tabellen als Extinktion pro Trockengewicht angegeben.

Nachdem die Extinktion der gesamten Farbstoffe bestimmt war, wurden sie in epi- und hypophasische Carotinoide aufgetrennt. Durch Zugabe von 90%igem Methanol und 3 Tropfen KOH (1 n) zu den in Petroläther gelösten Farbstoffen bildete sich eine petrolätherische Epi- und eine methanolische Hypophase, die durch Trennung in einem Scheidetrichter und mehrmalige Zugabe von Petroläther bzw. Methanol mit KOH zu den entsprechenden Phasen quantitativ getrennt wurden. Die Petrolätherfraktion wurde anschließend dreimal mit aqua dest. ausgewaschen, auf 10 ml eingeeengt und ihre Extinktion im Spektralphotometer gemessen (im folgenden als E_{Ges} bezeichnet). Um vergleichbare Werte zu erhalten, mußte die in Methanol gelöste Hypophase ebenfalls in Petroläther übergeführt werden. Da eine direkte Überführung nicht quantitativ möglich war, mußten die hypophasischen Carotinoide durch Zugabe von Benzol, 10%igem Ammonsulfat und starkes Ansäuern mit Eisessig zunächst in Benzol übergetrieben werden; nach Eindampfen der Benzolphase wurde der Farbstoff mit einer bestimmten Menge Petroläther aufgenommen und ebenfalls gemessen (im folgenden als H bezeichnet). Es erwies sich als äußerst wichtig, daß die Extrakte bei der Auftrennung in Epi- und Hypophase längere Zeit stehen blieben, besonders bei Proben mit höheren Belichtungszeiten, da sich die einzelnen Carotinoide der Epiphase fraktioniert aus der Hypophase abtrennen. Dies war schon daran zu erkennen, daß bei der ersten Trennung die petrolätherische Phase gelblich gefärbt war (hauptsächlich β -Carotin) nach wiederholter Trennung jedoch eine mehr rote Farbe zeigte, die vor allem auf das Lycopin zurückzuführen war. Um das Lycopin quantitativ

zu entfernen war es also notwendig, die Trennung mehrere Male zu wiederholen (4-5 mal) und dazwischen die Fraktionen längere Zeit (15 bzw. später 30 Min.) stehen zu lassen.

b) Quantitative Bestimmung der einzelnen Farbstoffkomponenten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.

Qualitative Versuche zur Auftrennung und Identifizierung der epiphasischen Carotinoide wurden von RAU und ZEHENDER (1959) ausgeführt. Sie trennten die Pigmente an einer Ca(OH)_2 -Säule und erhielten 7 Zonen: Rhodoxanthin (E 1), Lycopin (E 2), ein nicht identifiziertes Carotin (E 3), Neolycopin (E 4), Polycislycopin II (E 4a), β -Carotin (E 5) und E 6, das sehr wahrscheinlich ein Gemisch aus verschiedenen Komponenten ist.

Für die geplanten Untersuchungen schien diese Arbeitsweise zu zeitraubend und teilweise auch zu wenig genau. Es sollte deshalb zunächst eine befriedigende Methode gefunden und für die speziellen Bedürfnisse ausgearbeitet werden. Als solche bot sich die Dünnschichtchromatographie nach E. STAHL an, eine neuere Methode zur adsorptionschromatographischen Trennung von Stoffgemischen. Dieses Verfahren wurde bereits von IZMAILOR und SHRAIBER (1938), später von MEINHARD und Mitarbeitern (1948), sowie KIRCHNER und Mitarbeitern (1951) angewandt. Allgemeine Verbreitung fand die Dünnschichtchromatographie erst, nachdem E. STAHL sie vereinfachte und standardisierte. Für die vorliegenden Untersuchungen bewährte sie sich wesentlich besser als die Säulenchromatographie und zwar aus drei Gründen: 1. genügte eine weit kürzere Entwicklungsdauer, 2. war der Bedarf an Untersuchungssubstanz geringer und 3. konnte vor allem ein schärferer Trenneffekt erzielt werden. Bei diesen "offenen Säulen", wie die Platten auch genannt werden, wird aufsteigend entwickelt. Für die Auftrennung der Carotinoide nach dieser Methode galt es zunächst geeignete Adsorptionsmittel und Entwickler zu finden.

Folgende Lösungsmittel sowie Gemische aus ihnen wurden auf ihre Eignung geprüft: Benzin, Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Äther, Essigsäureäthylester, Aceton, Isopropanol, Äthanol, Schwefelkohlenstoff, Petroläther und Benzol. Als günstigster, wenn auch noch nicht voll befriedigender Entwickler erwies sich ein Gemisch aus Petroläther und Benzol.

Es wurde deshalb versucht durch Variieren des Adsorptionsmittels eine bessere Trennung zu erzielen. Dem Kieselgel wurden zu diesem Zweck verschiedene Adsorbentien in wechselnden Mischungsverhältnissen zugesetzt. Untersucht wurden: Ca(OH)_2 , CaCO_3 , Al_2O_3 , Zinkkarbonat und Magnesiumoxyd (teilweise nach persönlicher Mitteilung von E.C. GROB).

In weiteren Versuchen sollte geprüft werden, ob durch Veränderung des pH-Wertes eine bessere Trennung zu erzielen ist; dabei wurde das Kieselgel statt mit aqua dest. mit Puffergemischen bestimmter pH-Bereiche vermischt. Eine verbesserte Trennung konnte jedoch nicht beobachtet werden. Auch die Anwendung zweidimensionaler Chromatographie führte zu keiner schärferen Trennung.

Die beste Auftrennung der Pigmente wurde schließlich mit einer Trägersubstanz aus 15 g Kieselgel und 45 ml Wasser (für 5 Platten, 200 x 200 mm) erzielt. Entgegen den Angaben der Arbeitsvorschrift, wurde hier statt der doppelten, die dreifache Wassermenge verwendet; dadurch wurde die Schichtdicke herabgesetzt und die Trennung verbessert. Kein Unterschied in der Trennung konnte zwischen Platten, die im Trockenschrank und solchen die an der Luft genügend lange getrocknet waren, beobachtet werden. Als optimales Lösungsmittel erwies sich ein Gemisch aus 85 % Petroläther und 15 % Benzol. Um eine gesättigte Atmosphäre im Chromatographiergefäß zu erzielen, wurden Filterpapierstreifen in die Lösung eingehängt, wodurch vor allem auch die Laufzeit verkürzt wurde.

Bei der beschriebenen Trennungsart blieb die Zone 1^x (vergl. Abb. 1) nahe der Startlinie und nur undeutlich getrennt von Zone 1. Eine vollkommene Trennung dieser beiden Zonen wurde schließlich in einem zweiten Trennungsgang durch Einstellen der Platten in ein Gefäß mit Benzol als Entwickler, erreicht.

Ein nach dieser Methode entwickeltes Chromatogramm zeigt Abbildung 1 :

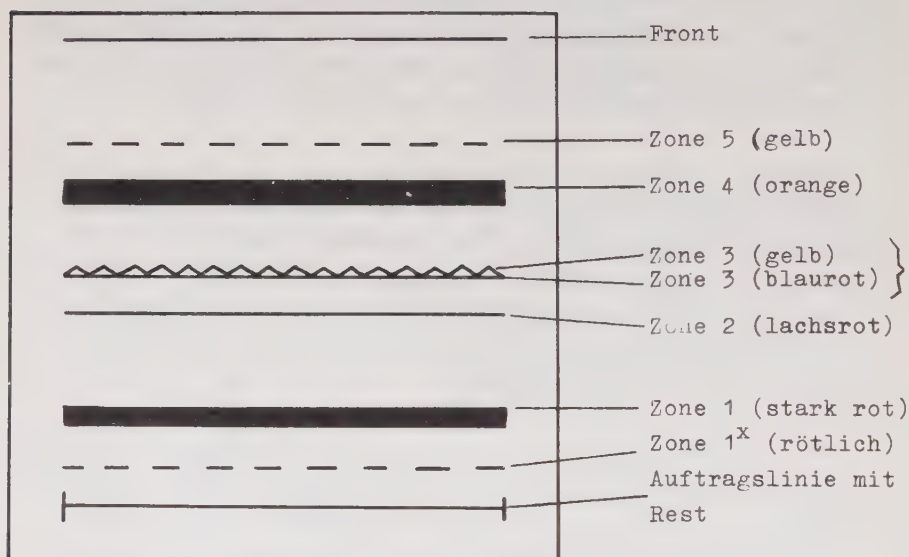


Abb. 1: Chromatogramm der epiphasischen Carotinoide.

Als äußerst wichtig für eine rasche und saubere Trennung erwies sich schließlich noch die Art des Auftrags der Substanz. Die Startlinie mußte so schmal wie möglich gehalten werden und die Konzentration der aufgetragenen Farbstoffe

durfte nicht zu hoch sein (bei hoher Konzentration zeigten die Zonen Zacken und vor allem die Zonen 2 und 3 blieben dicht zusammen). Um dennoch meßbare Farbstoffmengen aus allen Zonen zu erhalten, wurden zwei bis drei Chromatogramme pro Probe hergestellt und die entsprechenden Zonen beim Eluieren und Messen vereinigt. Bei allen Manipulationen war es notwendig, rasch zu arbeiten, da die betreffenden Farbstoffe äußerst empfindlich gegen Licht und vor allem gegen Sauerstoff sind. Ein Vorversuch, bei dem Auftragen und Eluieren in einem fast völlig verdunkeltem Raum und das Chromatographieren unter einer Schutzhülle geschah, ergab eine um etwa 5 % höhere Ausbeute als ein Versuch, bei dem am Licht gearbeitet wurde. Ein anderer Vorversuch zeigte, daß es aber vor allem der Sauerstoff ist, der die Zerstörung des Farbstoffes bewirkt. Dazu wurde eine Platte mit aufgetragenem Farbstoff mit einer zweiten Platte bedeckt, chromatographiert und am Licht belassen: ein Ausbleichen der Zonen erfolgte nur sehr langsam. Dagegen verblich eine an der Luft liegende Platte auch bei schwachem Licht sehr rasch. Es wurden daher die Zonen 2-4 sofort nach Herausnehmen der Platten aus dem ersten Chromatographiergemisch eluiert und nur die nahe der Startlinie sitzenden Farbstoffe in Benzol weiterchromatographiert.

Nach den bisherigen Versuchen bewährte sich also der folgende Arbeitsgang am besten, der für alle weiteren Untersuchungen angewendet wurde: Auf fettfreie Glasplatten (200 x 200 mm) wurde die Trägermasse (Kieselgel G (Merck) + die dreifache Gewichtsmenge Wasser) mit einem Streichgerät aufgetragen und die Platten an der Luft getrocknet. Nachdem die stark eingeeengte Farbstofflösung mit einer Glaskapillare auf einer 1,5 cm vom unteren Rand entfernten Startlinie aufgetragen war, wurden die Platten in entsprechende Glasgefäße (250 x 210 x 90 mm) mit Lösungsmittel (85 % Petroläther, 15 % Benzol) eingestellt. War durch Eintauchen von Filterpapierstreifen

in das Lösungsmittel eine gesättigte Atmosphäre garantiert, so wanderte das Entwicklergemisch in etwa 40 Min. bis zur maximalen Höhe, wobei sich der Farbstoff auf der Laufstrecke auftrennte. Der nicht aufgetragene Teil der Farbstoffe wurde mit Petroläther aufgenommen und deren Extinktion im Photometer gemessen (im folgenden als E_{Rest} bezeichnet), um aus der Differenz von $E_{\text{Ges}} - E_{\text{Rest}}$ die aufgetragene Farbstoffmenge zu ermitteln. Zum Eluieren wurden die einzelnen auf dem Kieselgel haftenden Farbstoffzonen quantitativ von der Platte entfernt und in kleine Reagenzgläser gegeben, die eine bestimmte Menge eines Eluiergemisches (Methanol-Benzol 1:1) enthielten. Diese Proben wurden kräftig durchgeschüttelt und gut verschlossen im Kühlschrank einige Stunden zur Sedimentation aufbewahrt. Zur Messung wurde die überstehende Farbstofflösung mit einer Giftpipette entnommen.

Wie aus Abb. 1 zu ersehen ist, war es jedoch nicht möglich, die Zone 3 von einem gelben, allerdings nur schwach ausgebildeten weiteren Pigment zu trennen; sie wurden deshalb beide zusammen eluiert und gemessen und im folgenden immer gemeinsam als Zone 3 bezeichnet. Zur Identifizierung der eigentlichen Zone 3 wurde die gelbe Komponente entfernt, sodaß ein reines Carotinoid vorlag. Die Zone 5 war bei längeren Belichtungszeiten deutlich zu erkennen und nahm (wie man schon visuell feststellen konnte) mit steigender Belichtungszeit zu. Ihre Extinktion war allerdings so gering, daß sie - wo nicht anders angegeben - mit dem ganzen Rest der Platte (nach Entfernung aller meßbaren Zonen) eluiert und als "Rest" gemessen wurde.

Durch die geschilderte Methode war es möglich, mit sehr geringem Verlust zu arbeiten. Epi- und Hypophase ergaben nach ihrer Auftrennung zusammen noch 95 % des Gesamtfarbstoffes, während nach dem Chromatographieren durch Addition

der Einzelzonen 85 % der gesamten Epiphase übrig blieben (Mittelwerte aus je 188 Einzelergebnissen). Eine Nachprüfung ergab, daß dieser Verlust nur auf die Methode und nicht auf die besondere Empfindlichkeit einzelner Carotinoide zurückzuführen ist.

III. E r g e b n i s s e

1. Identifizierung der einzelnen Farbstoffzonen.

Zunächst wurden die einzelnen Zonen der Epiphase qualitativ untersucht, um sie zu identifizieren; Auftrennung und Bestimmung der epiphasischen Carotinoide waren schon früher von RAU und ZEHENDER (1959) ausgeführt worden, konnten aber nun durch die raschere und schärfere Methode verbessert werden. Die einzelnen Zonen wurden rechromatographiert und die Absorptionsspektren aufgenommen, wobei in keinem Fall ein "cis-peak" zu beobachten war, was dafür spricht, daß die Carotinoide wohl nicht isomerisiert waren.

Die Zone 1^x (E1 von RAU und ZEHENDER) trat, wie schon dort beschrieben, in jedem Chromatogramm nur in äußerst geringen Mengen auf, eine nähere Bestimmung erfolgte daher nicht.

Für die Zone 1, das Lycopin, wurden folgende Absorptionsmaxima festgestellt: Hexan : ~445-53; 472; 503 mμ. Die Literaturangaben über die Absorptionsmaxima von Lycopin weichen, wie die folgende Tabelle (1) zeigt, erheblich voneinander ab.:

Autor	Absorptionsmaxima	Lösungsmittel
Karrer (1948)	447; 475,5; 506 m μ	in Benzin
Goodwin (1955)	446; 474; 506 m μ	in Hexan
Schlegel (1958)	445; 469; 500 m μ	in Petroläther
Rau und Zehender (1959)	~441-42; 468; 499 m μ	in Petroläther

Tab.1: Absorptionsmaxima für Lycopin nach verschiedenen Autoren (in Petroläther bzw. Hexan).

Ein Vergleich der oben angeführten Absorptionsmaxima mit den Werten in der Tabelle zeigt eine bessere Übereinstimmung mit den Literaturangaben als die von RAU und ZEHENDER bestimmten Maxima; möglicherweise war bei ihnen eine cis-Isomerisierung des Lycopins eingetreten, was in der vorliegenden Arbeit durch die neue Methode verhindert werden konnte.

Die Zone 2 (E 4 von RAU und ZEHENDER) zeigt folgende Absorptionsmaxima :

Hexan :	442; 468; 501 m μ
Benzol:	455; 483; 518 m μ
CS ₂ :	475; 503; 540 m μ
Chloroform:	~450-65; 481; 511 m μ

Das Absorptionsspektrum gibt Abbildung 2 wieder. Das untersuchte Carotinoid zeigt also im wesentlichen dieselben Absorptionsmaxima wie Lycopin, weshalb RAU und ZEHENDER die Möglichkeit in Betracht zogen, daß es sich um eine isomere Form des Lycopins, möglicherweise um Neolycopin handelt. KARRER gibt an, daß sich Lycopin bei höherer Temperatur oder durch 1-2 tages Stehen in Form einer wässrigen Lösung bis zu einem Gleichgewicht in dieses Isomer umwandelt. Gegen die Annahme einer Isomerisierung während der Aufarbeitung spricht allerdings die Beobachtung, daß die Stärke dieser Zone auch

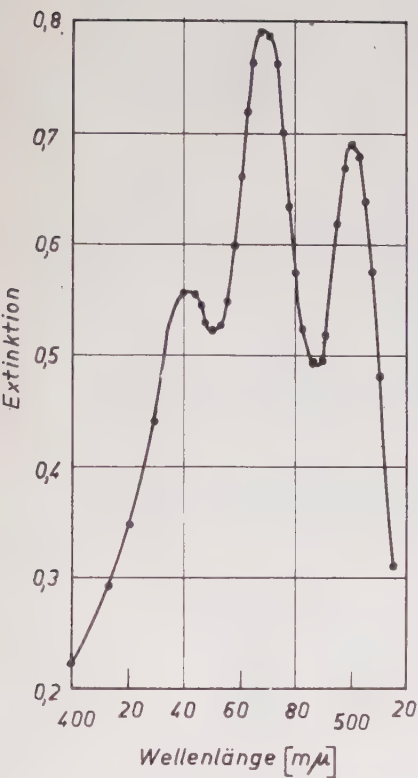


Abb. 2:

Absorptionsspektrum
der Zone 2 in Hexan.

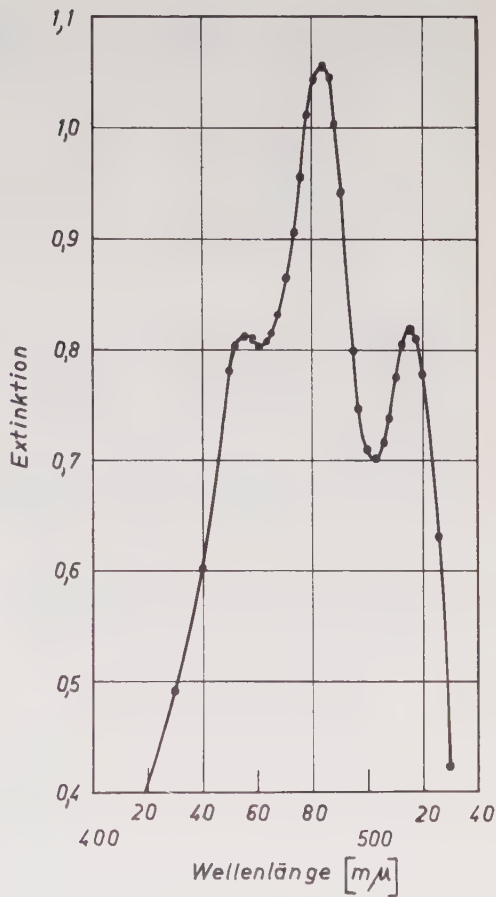


Abb. 3:

Absorptionsspektrum
der Zone 3 in Hexan.

bei Farbstoff, der längere Zeit aufbewahrt wurde, nicht zunahm.

Die Zone 3 (E 3 von RAU und ZEHENDER) hatte folgende Absorptionsmaxima :

Hexan :	456; 483; 516 m μ
Benzol:	~468-80; 500; 533 m μ
CS ₂ :	~488-500; 520; 554 m μ
Chloroform:	~468-78; 498; 529 m μ

Das Absorptionsspektrum der Zone 3 zeigt Abb. 3. RAU und ZEHENDER dachten an eine mögliche Identität dieser Zone mit dem von GOODWIN und LAND (1956) in Chromatium aufgefundenen Pigment P 481, das in Petroläther folgende Maxima besitzt: 454; 481; 514 m μ ; in CS₂: 492; 521; 558 m μ . Mit dieser Zone 3 hing eine lachsgelbe, sehr schwache Zone zusammen, die RAU und ZEHENDER als Polycislycopin II identifizierten.

Die Zone 4 stimmt in ihren Absorptionsmaxima mit den von RAU und ZEHENDER gefundenen überein, und wurde als β -Carotin identifiziert:

Hexan:	~430-40; 458; 488 m μ
Benzol:	~443-53; 472; 505 m μ
CS ₂ :	~455-60; 493; 524 m μ

Zone 5: Bei Versuchen mit Glukose und Methylenblau, auf die noch später einzugehen ist, konnte beobachtet werden, daß die sonst sehr schwach ausgeprägte Zone 5 in stärkerer Konzentration auftrat. Dadurch war eine eingehendere Untersuchung dieser Komponente möglich. Durch die verbesserte Trennungsmethode scheint es gelungen zu sein, aus der Fraktion E 6 von RAU und ZEHENDER einen weiteren Farbstoff zu isolieren, während die im UV absorbierenden möglichen Vorstufen an der

Lösungsmittel liefen und für die Untersuchungen nicht berücksichtigt wurden. Die Zone 5 zeigt folgende Absorptionsmaxima :

Hexan:	418-25;	446;	473 m μ
Benzol:	430-40;	460;	486 m μ
CH ₂ :	450-55;	479;	498-505 m μ
Chloroform:	430-35;	459;	478-90 m μ

Ihr Absorptionsspektrum ist in Abb. 4 wiedergegeben.

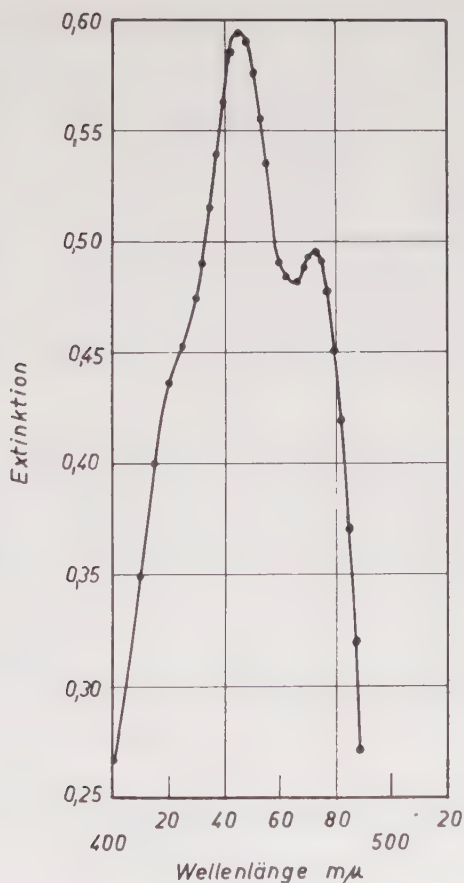


Abb. 4: Absorptionsspektrum der Zone 5 in Hexan.

Die Absorptionsmaxima und sein chromatographisches Verhalten stimmen am besten mit α -Carotin überein, das aber fast nur als Begleiter des β -Carotins auftritt; da dieses bei *Fusarium aquaeductuum* nicht vorkommt, kann nicht entschieden werden, ob es sich um α -Carotin oder einen anderen bekannten Farbstoff handelt.

2. Bildungsverlauf der einzelnen Komponenten des Carotinoidgemisches.

Die mit je 150 ml gepufferten Pilzsuspension gefüllten Gaswaschflaschen wurden verschieden lange belichtet, das gefärbte Pilzmycel sofort in Aceton gebracht und in der oben beschriebenen Weise extrahiert und gemessen. Den Verlauf der Pigmentbildung gibt Abb. 5 wieder. Wie aus der Kurve für den Gesamtfarbstoff zu ersehen ist, tritt in den ersten 12 Std. eine starke Pigmentierung ein. In diesem Zeitraum wird die maximale Farbstoffmenge gebildet, danach kommt es zu keiner merklichen Farbstoffzunahme mehr. Die Farbstoffsynthese verläuft also, wie erwartet (ZALOKAR, 1954, EBERHARD, RAU und ZEHENDER, 1961) in Form einer Sättigungskurve.

Es fiel nun bereits bei den früheren Untersuchungen von EBERHARD, RAU und ZEHENDER auf, daß das Absorptionsmaximum des Farbstoffgemisches im Verlauf der Carotinoidbildung vom kürzerwelligen Bereich bis etwa 475 m μ bei Proben mit abgeschlossener Pigmentsynthese wandert (Tab. 2).

1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.	8 Std.	24 Std.
455-58	458-60	463	471	475	475 m μ

Tab.2: Lage der Absorptionsmaxima des Gesamtfarbstoffs nach verschieden langen Reaktionszeiten.

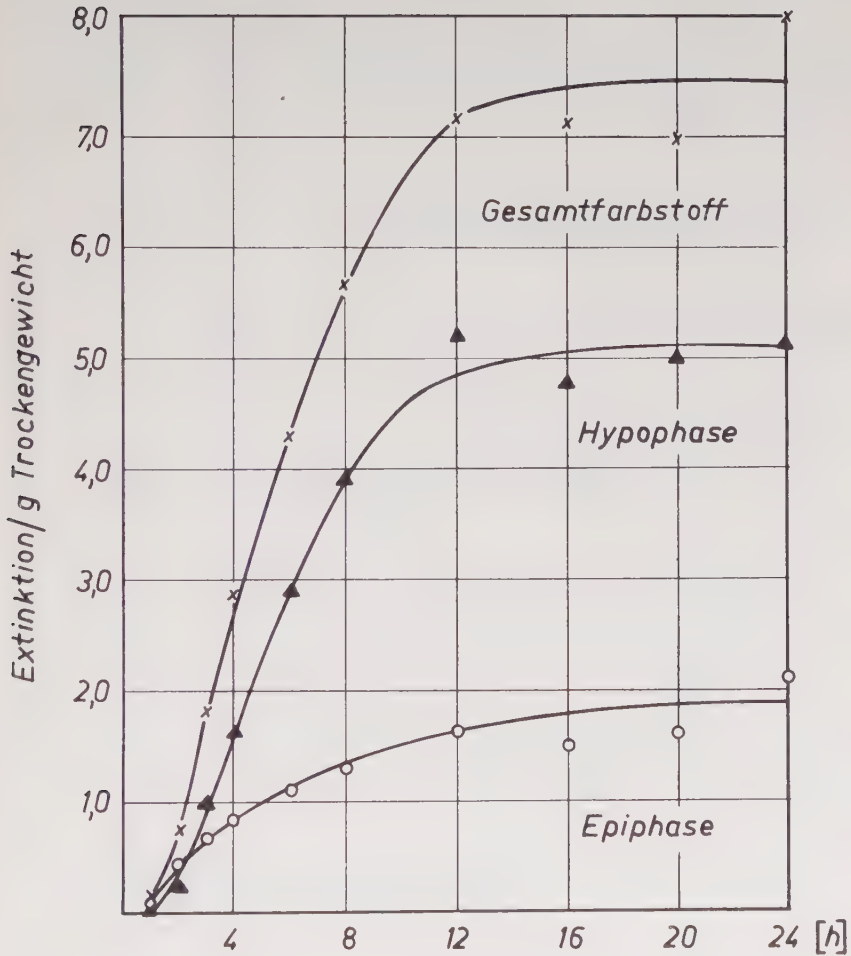


Abb. 5: Bildungsverlauf von Gesamtfarbstoff, Epi- und Hypophase.
Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
Ordinate: Extinktion pro g Trockengewicht.

Es lag nahe, die Veränderungen im Absorptionsmaximum mit einer unterschiedlichen Bildungsgeschwindigkeit der einzelnen Carotinoide zu erklären.

Die verschieden lange belichteten Farbstoffproben wurden deshalb in der oben beschriebenen Weise in Epi- und Hypophase getrennt.

Abbildung 6 zeigt die prozentuale Änderung der Verteilung der epi- und hypophasischen Carotinoide.

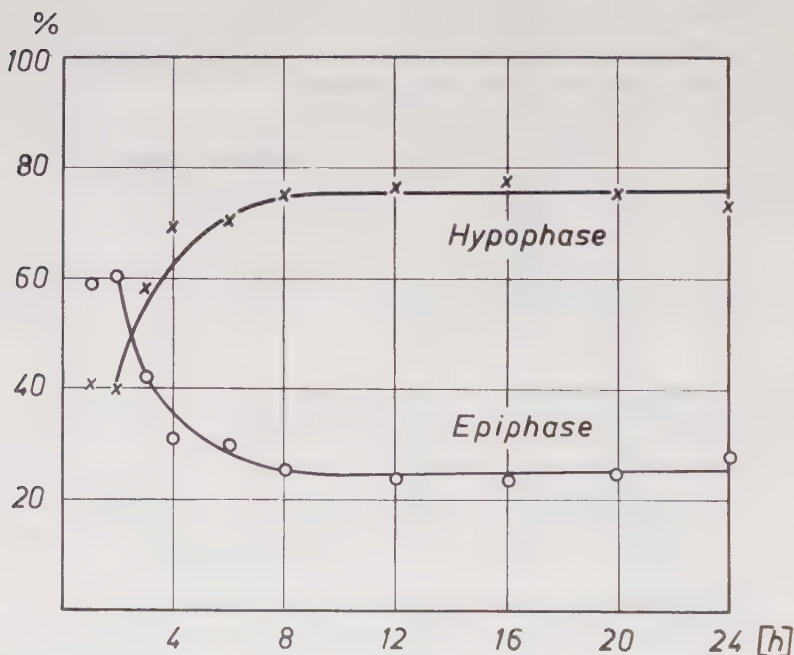


Abb. 6: Prozentuale Verteilung von epi- und hypophasischen Carotinoiden nach verschiedenen langen Belichtungszeiten.
Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
Ordinate: Prozent des Gesamtfarbstoffes.

Der prozentuale Anteil der Hypophase (Neurosporaxanthin) ist nach den beiden ersten Stunden geringer als der der epiphasischen Carotinoide, nimmt aber laufend, in den ersten 8 Stunden sogar steil zu und bleibt nach etwa 12 Stunden Belichtung annähernd konstant. Im gleichen Maße sinkt der Gehalt an epiphasischen Komponenten im Verlauf der Carotinoidbildung von etwa 60 % nach 1 Std. Belichtung auf rund 25 % des Gesamtpigments nach 24 Std.

Trägt man den Anteil der epi- und der hypophasischen Komponenten nicht in % des Gesamtfarbstoffes, sondern als Extinktion pro g Trockengewicht auf (Abb. 5), so erkennt man, daß die Epiphas bis zur 12. Stunde ansteigt und im weiteren Verlauf den erreichten Wert nahezu konstant beibehält. In gleicher Weise steigt die Kurve für die Hypophase, nachdem sie in den beiden ersten Stunden unter dem Wert für die Epiphas blieb, bis zu einer Belichtungszeit von 12 Std. steil an. Die Extinktion ändert sich bis zum Endwert nicht mehr wesentlich.

Es fiel nun weiterhin auf, daß auch das Hauptabsorptionsmaximum der Gesamtheit der epiphasischen Carotinoide vom kürzerwelligen Bereich mit zunehmender Belichtungszeit ansteigt (Tab.3).

1	2	3	4	6	8	12	16	20	24 Std.
455	457	460	460	460	465	470	470	470	475 mμ

Tab.3: Lage des Absorptionsmaximums der Epiphas nach verschiedenen Belichtungszeiten.

Das würde bedeuten, daß auch innerhalb der epiphasischen Carotinoide die einzelnen Komponenten verschieden schnell gebildet werden; auf diese Tatsache wird später noch einzugehen sein.

Da das Hauptmaximum der Hypophase (= Neurosporaxanthin) bei 475 m μ liegt, das gemeinsame Hauptmaximum der epiphasischen Carotinoide aber je nach Belichtungszeit bei 455-475 m μ , ist die Maximumverschiebung im Laufe der Bildung des Gesamtfarbstoffes leicht zu erklären. Bei den niederen Belichtungszeiten (1-2 Std.) bestimmt die Epiphasen (die hier ein niederes Maximum von 455-457 m μ hat) das Gesamtmaximum. Auch bei einer Belichtung von 3 bis 4 Std. ist der Anteil an epiphasischen Carotinoiden noch relativ hoch (ihr Maximum liegt hier bei 460 m μ), sodaß sich mit der schon überwiegenden Hypophase ein zwischen diesen Werten liegendes Gesamtmaximum von 463-471 m μ ergibt. Bei höheren Belichtungszeiten, bei denen dann einerseits deutlich die Hypophase dominiert und andererseits auch das Maximum der Epiphasen auf 475 m μ angestiegen ist, wird das Gesamtmaximum von 475 m μ verständlich.

Wie bereits erwähnt, läßt sich schon auf Grund der Maximumverschiebung innerhalb der Epiphasen vermuten, daß auch die verschiedenen epiphasischen Carotinoide verschieden schnell gebildet werden. Zur Prüfung dieser Frage wurde nun die quantitative Zusammensetzung der Epiphasen nach verschiedenen Belichtungszeiten untersucht. Die von der Hypophase befreite Epiphasen wurde in der oben beschriebenen Weise mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Es fiel dabei auf, daß die Epiphasen bei den kürzeren Belichtungszeiten neben der schon erwähnten Absorptionsmaximumverschiebung zum kürzerwelligen Bereich, eine mehr gelbliche Farbe zeigte, während bei abgeschlossener Carotinoidbildung die Farbe mehr orange oder sogar rot wurde. Trägt man in ähnlicher Weise wie für Epi- und Hypophase den Anteil der beiden epiphasischen Hauptcarotinoide des Lycopins und γ -Carotins, als Extinktion pro g Trockengewicht auf, so sieht man (Abb. 7a), daß die Lycopinmenge nach den beiden ersten Stunden noch sehr gering ist, bis 12 Std. Belichtung steil und von hier bis zum Endwert nur noch geringfügig zunimmt. Dagegen liegt der Anteil an γ -Carotin schon nach 1 Std. Belichtung höher als der des Lycopins und nimmt

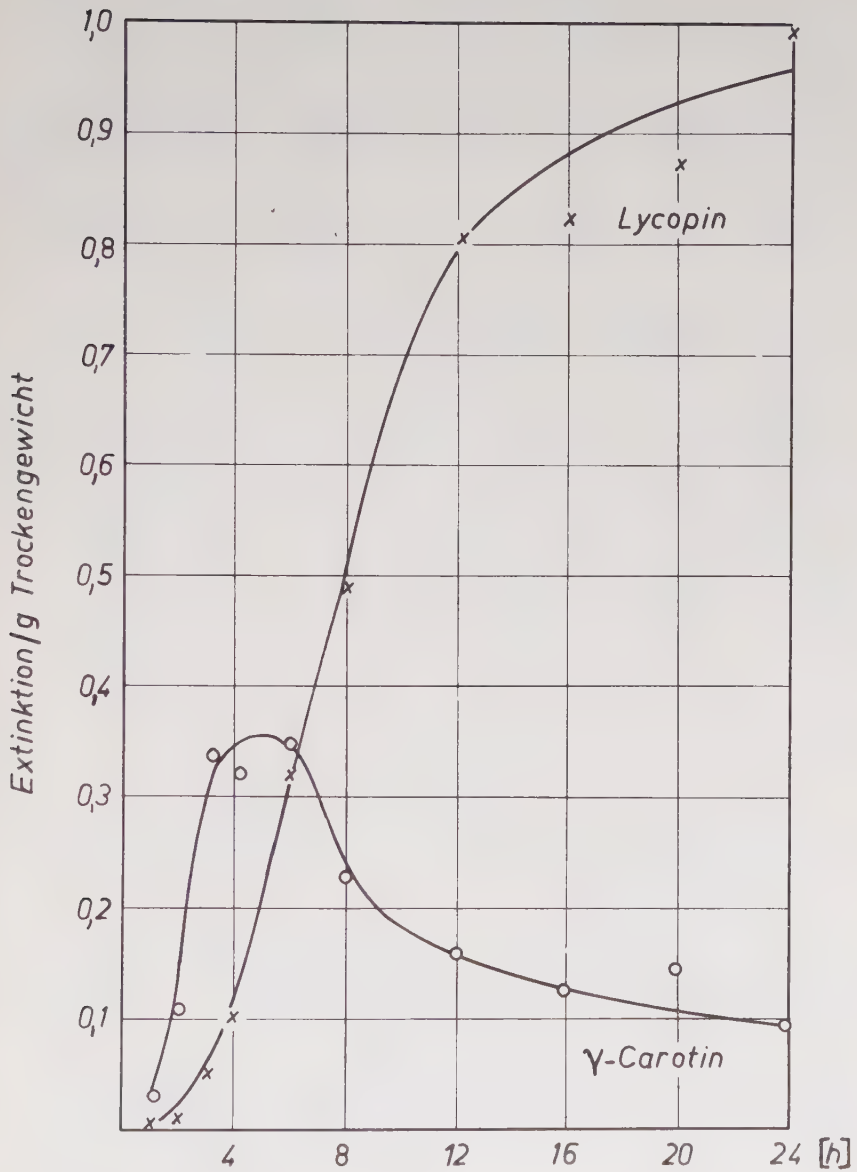


Abb. 7a: Bildungsverlauf von γ -Carotin und Lycopin.
Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
Ordinate: Extinktion pro g Trockengewicht.

bis etwa 5 Std. Belichtung stark zu, um dann zunächst rasch und ab 12 Std. langsamer abzunehmen. Nach 12 Std. Belichtung scheinen die wesentlichen Prozesse der Carotinoidsynthese abgeschlossen zu sein, und es kommt nur noch zu geringfügigen Umlagerungen. Berücksichtigt man nun noch die verschiedenen Extinktionskoeffizienten für γ -Carotin ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2720$) und für Lycopin ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 3470$) und rechnet man die Extinktionswerte dieser beiden Carotinoide auf absolute Mengen um, so ergibt sich (Abb. 8), daß sich die beiden Komponenten in ihrer Menge weniger unterscheiden als das Verhältnis der Extinktionen ausdrückt. Nimmt man nun an, daß das Lycopin auf Kosten des γ -Carotins gebildet wird, so müßten sich die Werte der Lycopinzunahme mit denen der γ -Carotinabnahme annähernd decken. Schon ein Vergleich der Abbildungen 7a und 8 zeigt, daß die beiden Kurven in der letzteren Darstellung genähert sind, sodaß zahlenmäßig eine Umwandlung des einen Carotinoids in das andere denkbar wäre. Der noch sehr steile Anstieg des Lycopins zwischen 8 und 12 Std. steht einem allerdings nicht so steilen Abfall des γ -Carotins gegenüber. Abb. 7b zeigt jedoch wie gerade in diesem Zeitraum eine kräftige Abnahme der Zone 3 stattfindet, sodaß die Bildung von Lycopin sowohl in Relation zu der Abnahme von γ -Carotin, als auch von der Zone 3 stehen könnte.

3. Einfluß der Lichtintensität auf die Zusammensetzung des Carotinoidgemisches.

Über die Wirkung des Lichtes auf die Carotinoidsynthese liegen verschiedene Untersuchungen vor, vor allem über den Einfluß der Menge und der Intensität des Lichtes.

EBERHARD, RAU und ZEHENDER (1961) stellten für *Fusarium aquaeductum* eine Zunahme der Carotinoidsynthese mit steigender Belichtungszeit fest. Dabei war die gebildete Farb-

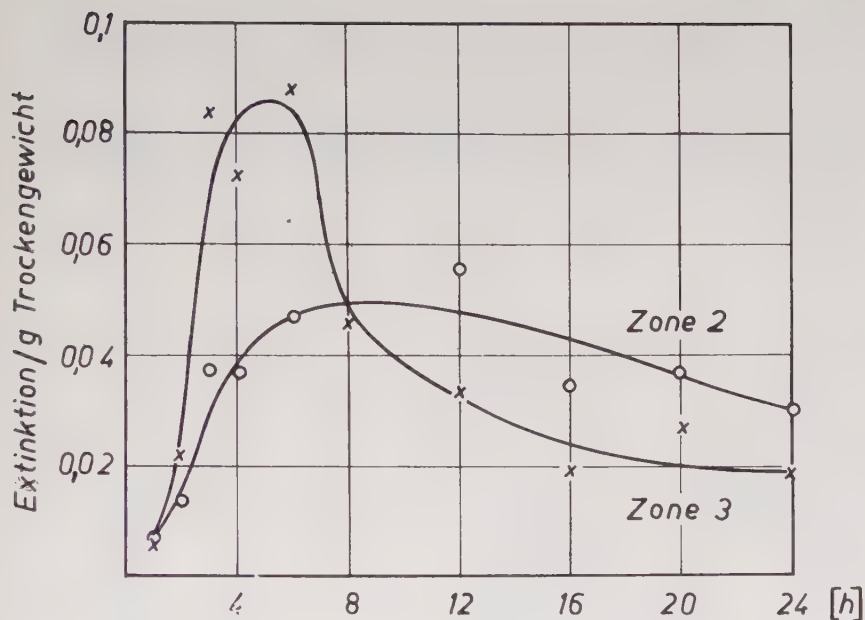


Abb. 7b: Bildungsverlauf der Zone 2 und 3.
 Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
 Ordinate: Extinktion pro g Trockengewicht.

stoffmenge nicht nur von der Belichtungszeit, sondern auch von der Intensität abhängig; im Gegensatz zu den Ergebnissen bei *Neurospora crassa* (ZALOKAR, 1955), bei denen gleiche Lichtmengen (gebildet aus dem Produkt Intensität mal Zeit) je nach der Belichtungszeit zu unterschiedlicher Farbstoffproduktion anregten, wobei längere Belichtungszeiten wirkungsvoller waren, bewirken bei *Fusarium aqueductuum* gleiche Lichtmengen stets die Bildung gleicher Farbstoffmengen.

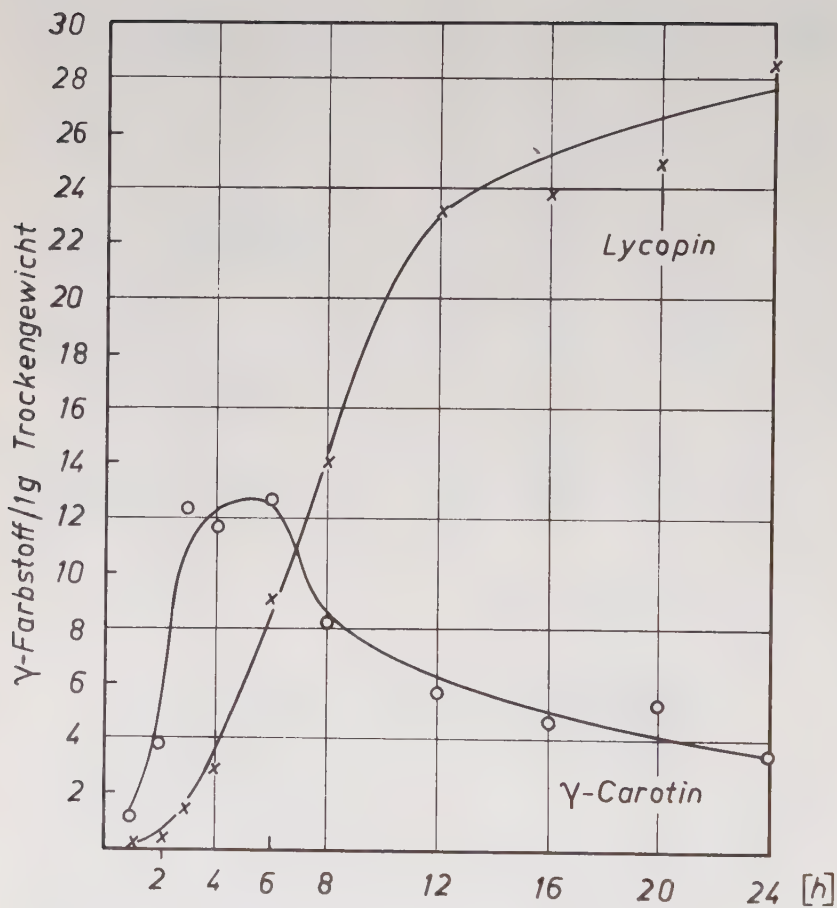


Abb. 8: Bildungsverlauf von γ -Carotin und Lycopin auf absolute Werte umgerechnet.
Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
Ordinate: Farbstoff pro 1 g Trockengewicht.

RINNER (1962) zeigte in Versuchen mit sehr geringen Intensitäten (10 Lux), daß auch in diesem Bereich die Carotinoidproduktion vom Logarithmus der Lichtmenge abhängig ist. Eine Lichtsättigung der Carotinoidsynthese wurde mit Weißlicht nur bei sehr hohen Intensitäten (50 000 - 100 000 Lux) erreicht.

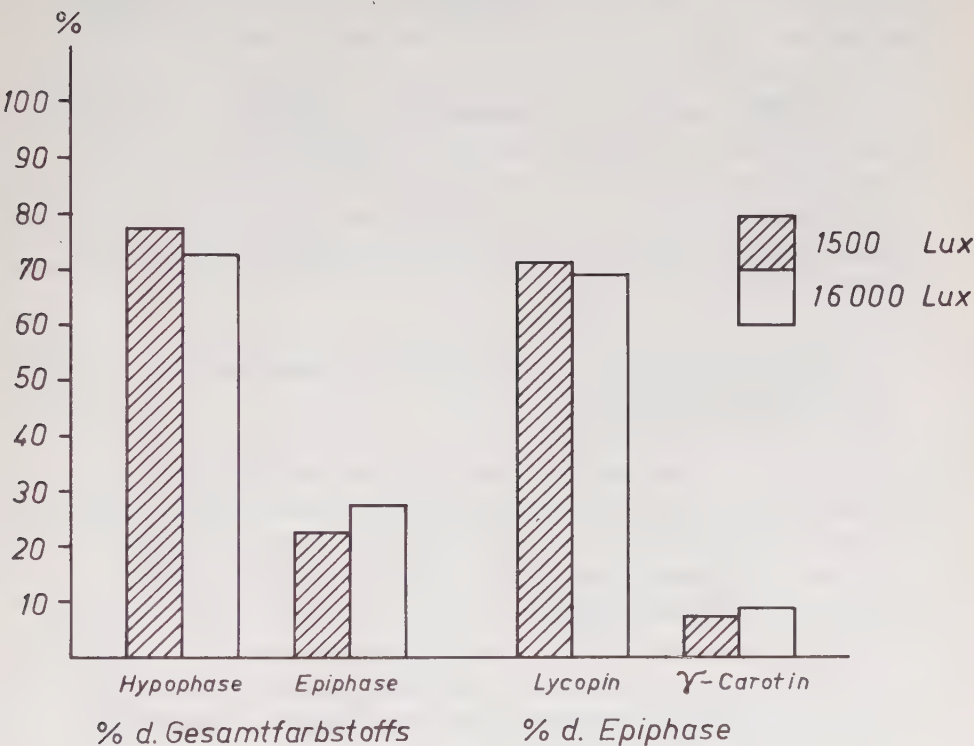


Abb. 9: Prozentuale Anteile der Hauptfraktionen bei verschiedenen Lichtintensitäten.

Es sollte nun geprüft werden, ob verschiedene Intensitäten auch einen qualitativen Einfluß auf die Carotinoidsynthese

ausüben, d.h. ob sich dabei die Zusammensetzung der Farbstoffe ändert. Die verschiedenen Intensitäten wurden durch Variieren des Abstandes der Proben von der Lichtquelle hergestellt; Pilzproben wurden mit 1500 bzw. 16 000 Lux 24 Std. lang bestrahlt, dann wurde der Farbstoff extrahiert und in die Komponenten aufgetrennt. Einen Vergleich der wichtigsten Fraktionen (Epiphasen und Hypophasen, sowie aus der Epiphasen β -Carotin und Lycopin) zeigt Abb. 9. Zwischen den beiden Proben trat bei keiner der Hauptzonen ein merklicher Unterschied auf; die Lichtintensität scheint also keinerlei Einfluß auf die Zusammensetzung, sondern nur auf die absolute Menge der Pigmente zu haben. Dieses Ergebnis steht allerdings im Gegensatz zu den Untersuchungen von MASE (1959), der bei *Penicillium sclerotiorum* mit niedrigeren Lichtintensitäten (1 foot candle) eine relative Förderung der Bildung von Xanthophyllen und sauren Pigmenten erhielt.

4. Einfluß von Glukosefütterung auf die Zusammensetzung des Pigmentgemisches.

Bei Mikroorganismen scheinen die Beziehungen zwischen Pigmentierung und Kulturbedingungen extrem verschieden zu sein. So fanden SCHOPFER und GROB bei *Phycomyces* (1950), daß das Wachstum je nach dem Medium mit oder ohne Carotinoidproduktion stattfinden konnte.

In früheren Untersuchungen hat EBERHARD (1960) bereits die Abhängigkeit der Farbstoffbildung vom Substrat untersucht; dabei wurde festgestellt, daß durch Glukosezugabe die Farbstoffbildung stark gefördert wird. Eine Beobachtung von BEEKMANN (1953) an etiolierten Weizenkeimlingen zeigte eine ähnliche Erscheinung. Während die normale Carotinoidsynthese nach 8 Tagen konstant blieb, konnte bei Zufütterung von Glukose auch nach dieser Zeit noch Carotinoidsynthese erfolgen. Dies ist ein Hinweis auf die Wichtigkeit des Kohlenhydratumsatzes für die Carotinoidsynthese auch bei höheren Pflanzen.

Bei Versuchen von GOODWIN und WILLMER (1952) an *Phycomyces* wurde dem Pilz neben Glukose eine Stickstoff-Quelle geboten; in den vorliegenden Versuchen wurden dagegen keine Stickstoffverbindungen zugesetzt, um eine zusätzliche Plasmavermehrung des Pilzes auszuschließen. Dadurch stand dem Pilz bei Glukosezugabe der Zucker ausschließlich als zusätzliche Energie- und Baustoffquelle für eine vermehrte Farbstoffproduktion zur Verfügung.

Bei *Fusarium aquaeductuum* ist die Farbstoffbildung bei Zugabe von 1 % Glukose nicht wie bei Zucker-freier Kultur nach 8-10 Std. abgeschlossen, sondern steigt bis etwa 72 Std. weiter an (EBERHARD, 1960). Nach neueren Untersuchungen von SCHUB (1962) geht die Farbstoffbildung unter Dauerlicht sogar bis zur längsten untersuchten Zeit von 11 Tagen weiter.

Es war nun von Interesse, wie sich diese Steigerung auf die Zusammensetzung des Gesamtpigmentes auswirkt. Den Pilzproben wurden je 1 % Glukose zugesetzt, dann erfolgte Belichtung, Farbstoffextraktion und Auftrennung in der oben beschriebenen Weise. Die prozentuale Verteilung der epi- und hypophasischen Carotinoide zeigt Abb. 10.

In den ersten Stunden verlaufen die Kurven analog denen für die Proben ohne Glukosezugabe: bis zu 2 Stunden liegen die Werte für die Epiphase höher als die für die Hypophase; bis zur 12. Stunde folgt dann ein starkes Absinken der Epiphase und ein entsprechender Anstieg der Hypophase. Vergleicht man den weiteren Verlauf dieser Kurve mit dem entsprechenden Kurvenverlauf ohne Glukosezugabe (zu jedem Glukosewert wurde ein Vergleichswert ohne Glukose, aber bei der gleichen Belichtungszeit ermittelt), so kann man feststellen, daß im Gegensatz zu den Meßwerten ohne Glukose diejenigen bei Glukosezusatz von der 24. Stunde an nicht

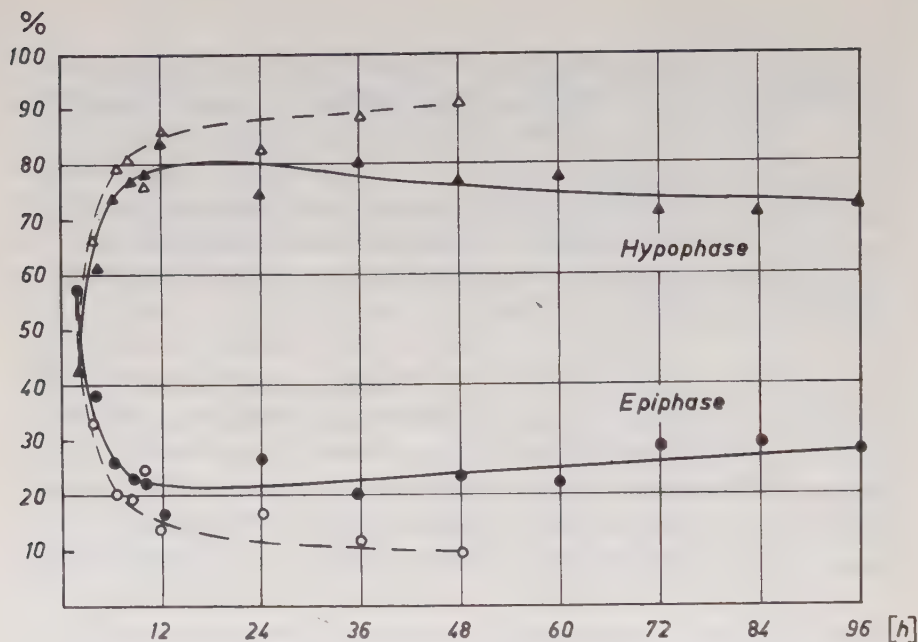


Abb. 10: Prozentuale Verteilung der Epi- und Hypophase mit und ohne Zugabe von Glukose.
Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
Ordinate: Prozent des Gesamtfarbstoffs.

- Epiphase mit Glukose;
- ▲—▲ Hypophase m. Glukose;
- Epiphase ohne Glukose;
- Δ---Δ Hypophase ohne Glukose;

konstant bleiben, sondern für die Epiphase leicht ansteigen und für die Hypophase entsprechend absinken. Durch Zugabe von Glukose wird also die Bildung der epiphasischen Pigmente in etwas stärkerem Maße gefördert als die der hypophasischen, was besonders bei sehr langen Belichtungszeiten zum Ausdruck kommt.

In Abb. 11 sind nun die absoluten Werte, d.h. die Extinktionen pro 1 g Trockengewicht dargestellt.

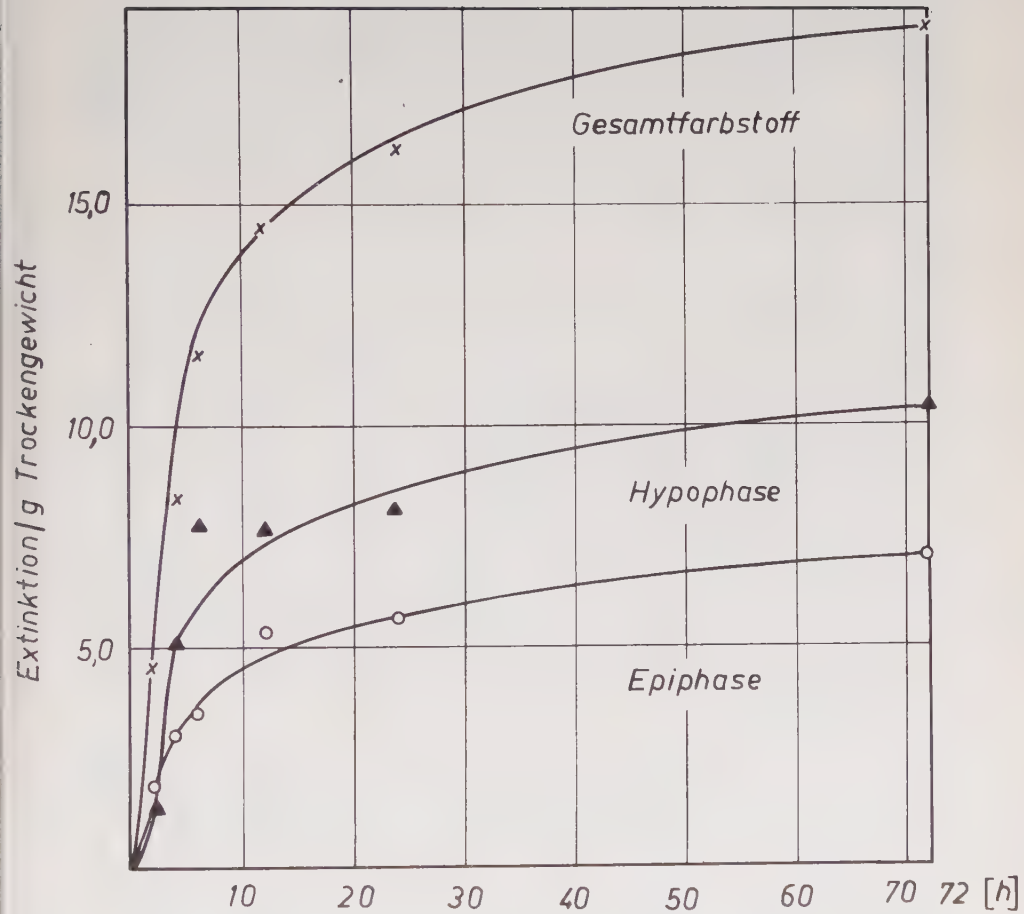


Abb. 11: Verlauf der Carotinoidsynthese bei Glukosefütterung.
Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
Ordinate: Extinktion pro g Trockengewicht.

Bis etwa zur 5. Stunde nach Beginn der Belichtung beeinflusste die Glukosefütterung den Verlauf der Carotinoidbildung nicht; erst von diesem Zeitpunkt an zeigen die betreffenden Glukosekurven eine $\pm$ starke Förderung gegenüber den Kurven ohne Glukose. (Abb. 5) Eine Erklärung wäre vermutlich in folgender Weise möglich: während der ersten 4-5 Stunden verläuft die Synthese mit und ohne Glukosezugabe gleich, da der Pilz noch genügend endogene Reservestoffe besitzt. Nach dieser Zeit kommt es jedoch langsam zu einer endogenen Substratverarmung. Werden nun aber von außen Nährstoffe geboten, so können neue Pigment-Vorstufen synthetisiert werden und die Carotinoidbildung kann damit weiter laufen.

Nähere Anhaltspunkte über die Biosynthese der Carotinoide bei Substratzugabe ergeben sich aus der Veränderung der Mengenverhältnisse der einzelnen epiphasischen Carotinoide. Abb. 12 zeigt den Verlauf der Lycopin und γ -Carotinbildung bei einem über 72 Stunden laufenden Versuch. Während der Lycopingehalt bis 12 Std. stark zunimmt und dann etwa konstant bleibt, nimmt das γ -Carotin zunächst, ganz analog den Verhältnissen ohne Glukose, ungefähr von der 4. Stunde an ab. Ohne Glukose setzt sich dieser Abfall bis zum Endwert nach 24 Std. fort, bei Glukosezufuhr dagegen kehrt die Kurve zwischen der 8. und 9. Stunde wieder um, d.h. der γ -Carotingehalt nimmt erneut zu und zwar bis zum Endwert nach 72 Stunden.

Ein Blick auf die Menge der übrigen Farbstoffkomponenten zeigt deutlich, daß diese zahlenmäßig neben den beiden Hauptfraktionen weit zurücktreten. Ein Vergleich mit den entsprechenden Werten ohne Glukose (Abb. 13) läßt dennoch deutlich die stärkere prozentuale Beteiligung der einzelnen Fraktionen bei Glukosezugabe gegenüber den anderen Werten erkennen. Während bei Werten ohne Glukose die Hypophase stark vorherrscht und unter den epiphasischen Carotinoiden nur noch das Lycopin in größerer Menge auftritt, ist bei den Glukose-

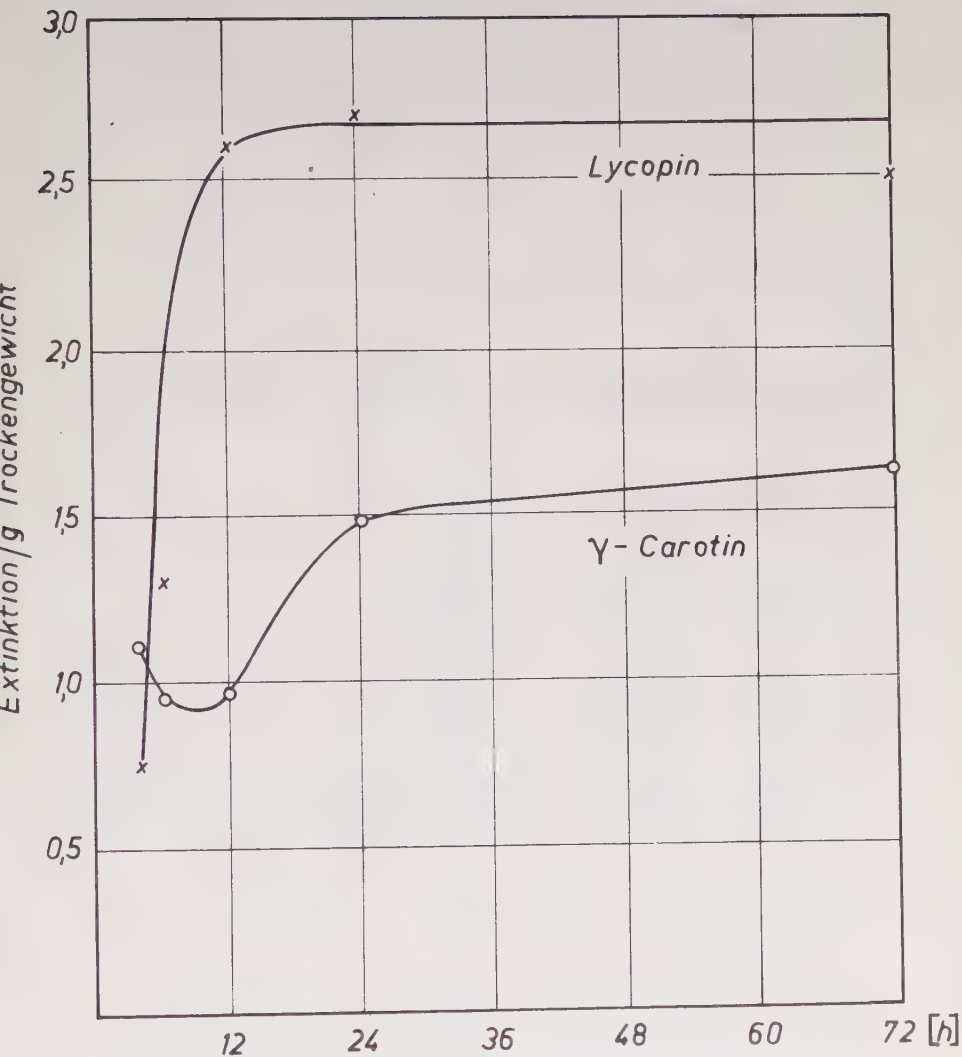


Abb. 12: Bildungsverlauf der beiden epiphasischen Hauptcarotinoide bei Zugabe von 1 % Glukose.
Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
Ordinate: Extinktion pro g Trockengewicht.

werten das Verhältnis zwischen Epi- und Hypophase weit mehr ausgeglichen und unter den epiphasischen Carotinoiden tritt der Anteil an Lycopin zugunsten aller übrigen Zonen, also des β -Carotins, der Zone 2 und 3 zurück. Die Werte bei Glukosegabe nach 24 und 72 Stunden Dauerlicht (Abb. 13) zeigen nur noch geringe Änderungen der prozentualen Anteile.

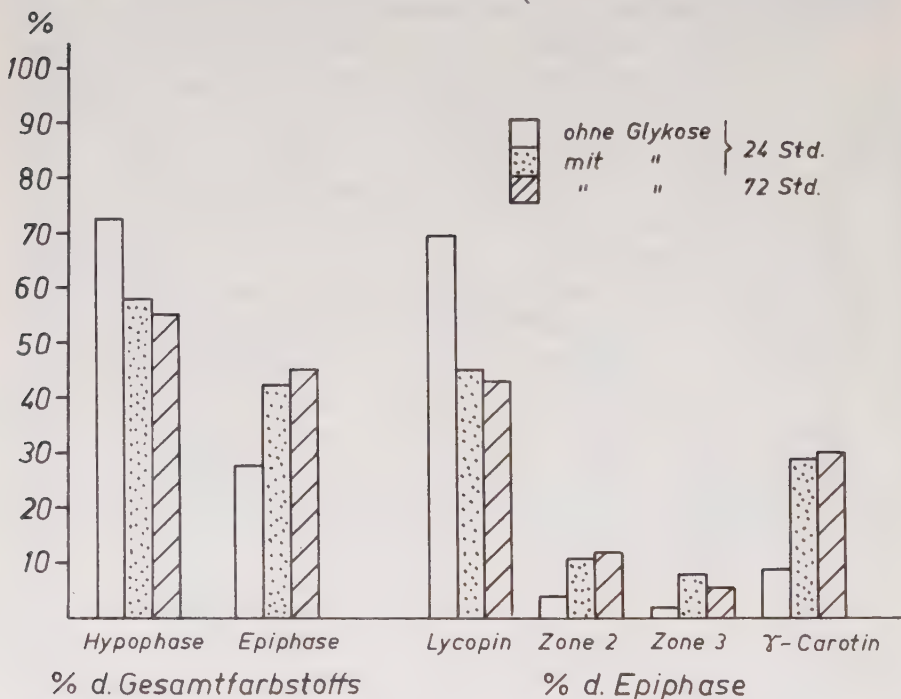


Abb. 13: Vergleich der einzelnen Fraktionen (in %) mit und ohne Glukose.

Die Möglichkeit einer Umwandlung des γ -Carotins in Lycopin ist bereits diskutiert worden. Diese Annahme erfährt durch die vorliegenden Ergebnisse eine weitere Unterstützung. In den ersten Stunden, in denen sich die Wirkung der Glukose noch nicht bemerkbar macht, verläuft die Synthese in der schon besprochenen Weise. Nach einiger Zeit, im vorliegenden Falle nach 8-9 Stunden, zeigt sich dann ein Einfluß des zugeführten Substrats. Das

γ -Carotin wird zwar zunächst teilweise zur Synthese des Lycopins verbraucht, es kann aber aus dem zugesetzten Nährstoff im Licht wieder synthetisiert werden.

5. Einfluß von Methylenblau auf die Zusammensetzung des Carotinoidgemisches.

Da sich Methylenblau schon bei anderen lichtabhängigen Vorgängen als wirksamer "Sensibilisator" erwiesen hatte, und ZEHENDER (unveröffentlicht) bei früheren Versuchen gefunden hatte, daß die Farbstoffausbeute bei Zugabe von Methylenblau zur Pilzsuspension weiter gesteigert werden kann, sollte noch untersucht werden, ob die Förderung der Pigmentsynthese auf einer vermehrten Bildung aller Carotinoidfraktionen beruht oder ob dabei einzelne Komponenten bevorzugt werden. Weiterhin sollte geprüft werden, welche Wirkung eine gleichzeitige Zugabe von Methylenblau und Glukose hat.

Dazu wurden Pilzproben bei Zusatz von $2 \cdot 10^{-5}$ mol Methylenblau (nach Versuchen von ZEHENDER war diese Konzentration am wirksamsten) allein oder bei gleichzeitiger Glukosegabe belichtet und in der oben beschriebenen Weise analysiert. In Abb. 14 sind zunächst die Gesamtmengen der unter den verschiedenen Bedingungen gebildeten Farbstoffe einander gegenübergestellt.

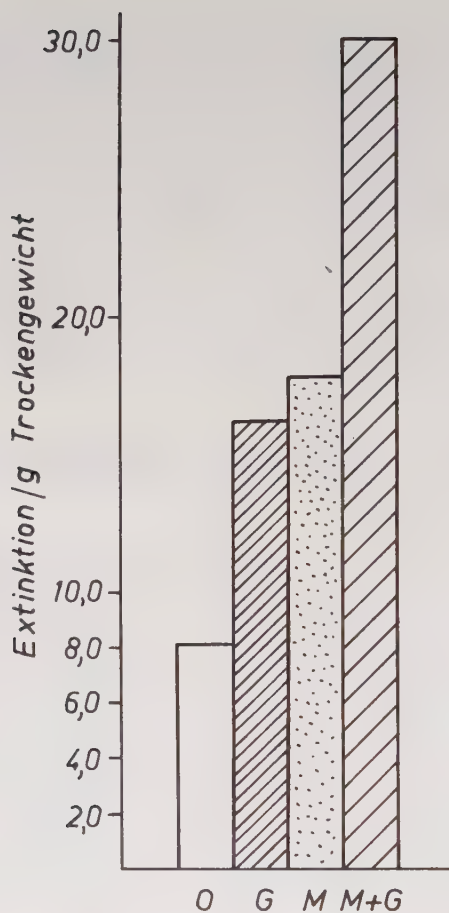


Abb. 14: Farbstoffbildung nach 24 Std. Dauerlicht.

O = ohne Glukose,
G = mit Glukose,
M = mit Methylenblau,
M+G = mit Methylenblau und Glukose.

Ordinate: Extinktion pro g Trockengewicht.

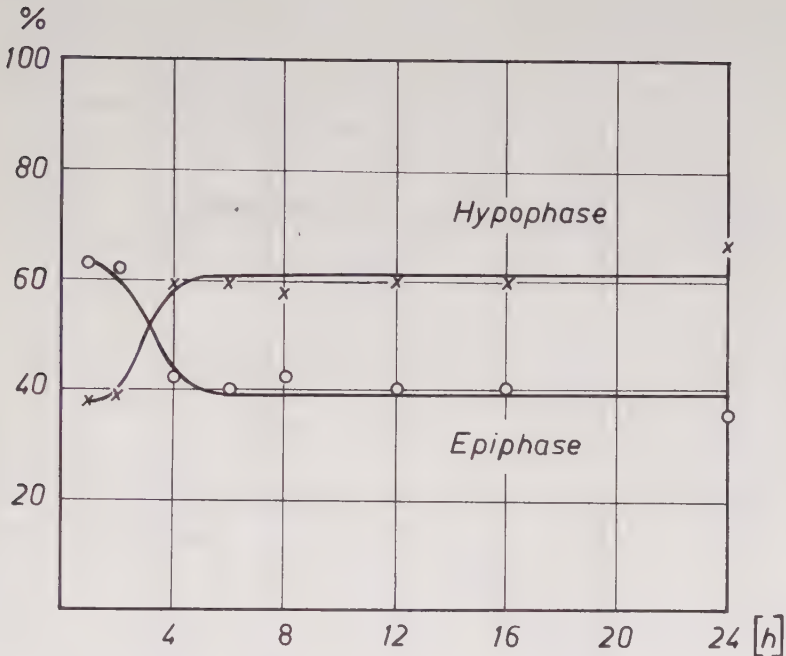


Abb. 15: Prozentuale Verteilung von Epi- und Hypophase bei Zugabe von Methylenblau.
Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
Ordinate: Prozent des Gesamtfarbstoffes.

Abbildung 15 zeigt für die prozentuale Verteilung von Epi- und Hypophase ein analoges Bild wie ohne Methylenblauzugabe, allerdings liegen die Anteile an epiphasischen Carotinoiden hier höher und entsprechend die der hypophasischen tiefer, was sich in der Darstellung durch eine stärkere Näherung der beiden Kurven ausdrückt (vergl. Abb. 6).

Wie Abb. 16 zeigt ist jedoch der Bildungsverlauf derselbe wie ohne Methylenblau (vergl. Abb. 5). Ein Unterschied kommt nur in der Menge der gebildeten Carotinoide zum Ausdruck.

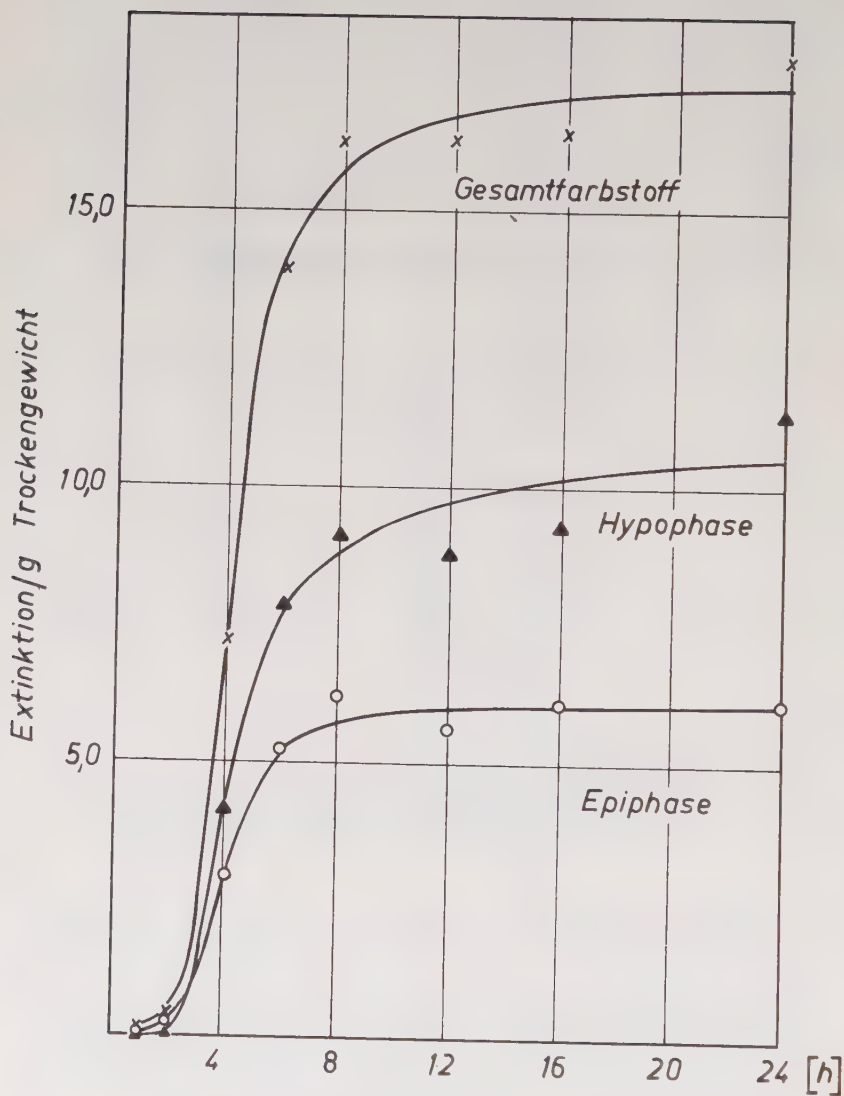


Abb. 16: Bildungsverlauf des Gesamtfarbstoffes, der Epi- und der Hypophase in Gegenwart von Methylenblau.
Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
Ordinate: Extinktion pro g Trockengewicht.

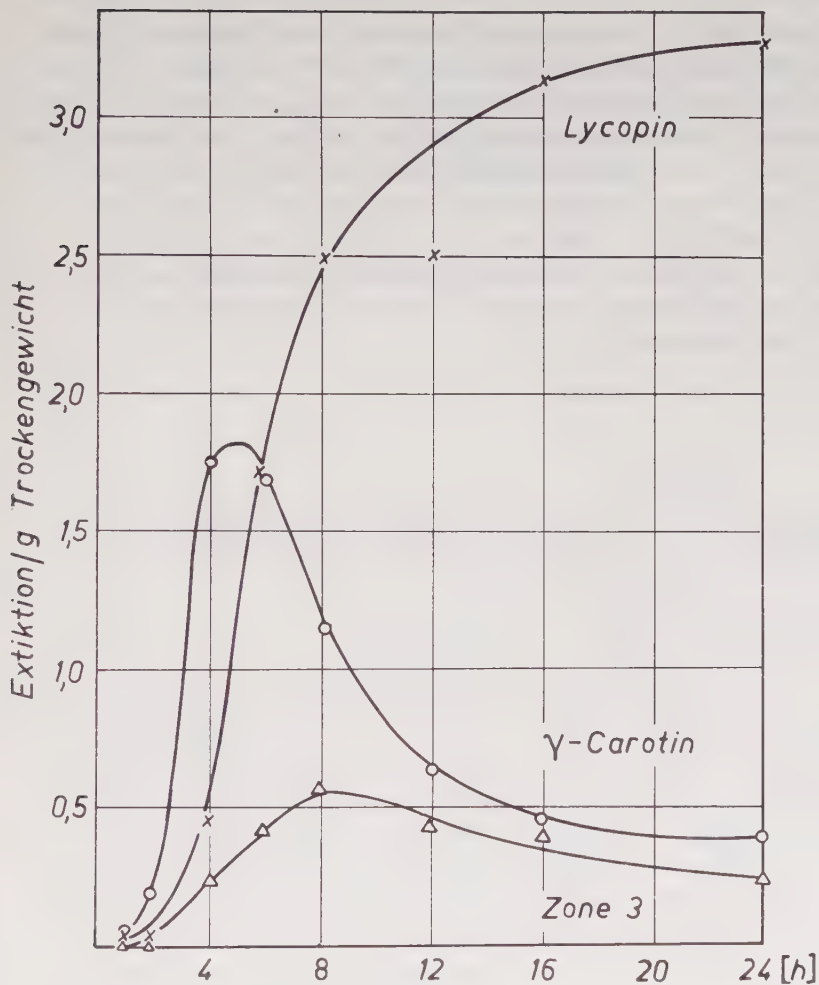


Abb. 17a: Bildungsverlauf von Lycopin, γ -Carotin und Zone 3 in Gegenwart von Methyleneblau.
Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
Ordinate: Extinktion pro g Trockengewicht.

Betrachtet man den in Abb. 17 dargestellten Verlauf der Entstehung der einzelnen Komponenten, so ist für die beiden Hauptfraktionen keinerlei Änderung festzustellen (vergl. Abb. 7a). Auffallend ist jedoch der relativ hohe Anteil der Zone 3, während Zone 2 in so geringem Maße an der Zusammensetzung beteiligt ist, daß sie vernachlässigt werden kann. Wie bei den Versuchen ohne Methylenblau (s. Abb. 7b) nimmt die Menge der Zone 3 nach einigen Stunden Belichtung (hier nach 8 Stunden) ab. Dies unterstützt ebenfalls die Annahme, daß sich das Lycopin auf Kosten dieser Zone und des -Carotins bildet, wenn kein Substrat (wie etwa Glukose) zugesetzt wird. Auffallend bei diesen Versuchen ist weiterhin der relativ hohe Anteil der Zone 5, deren Bildungsverlauf in Abb. 17b dargestellt ist.

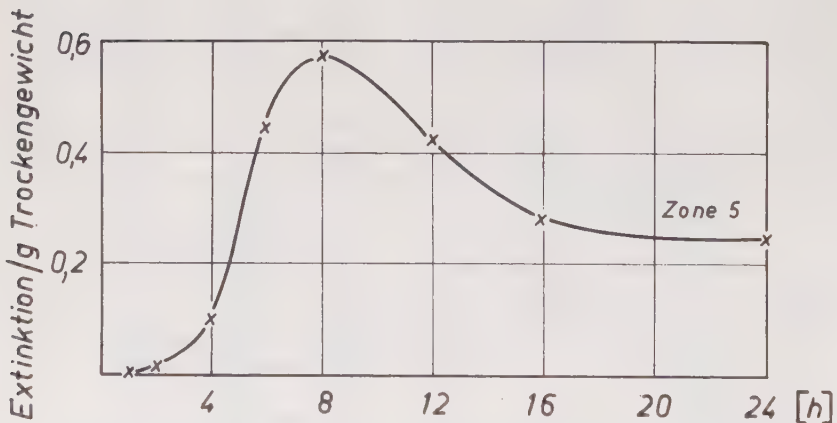


Abb. 17b: Bildungsverlauf der Zone 5 in Gegenwart von Methylenblau.
Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
Ordinate: Extinktion pro g Trockengewicht.

In Gegenwart von Methylenblau zeigt sich also neben der Steigerung der gesamten Farbstoffproduktion vor allem eine Förderung der Zonen 3 und 5.

In einer weiteren Versuchsserie sollte nun das Zusammenwirken des Substrats mit dem "Sensibilisatoreffekt" des Methylenblaus untersucht werden. Dazu wurden den einzelnen Proben je 1 % Glukose und $2 \cdot 10^{-5}$ mol Methylenblau zugesetzt; alle übrigen Versuchsbedingungen blieben unverändert.

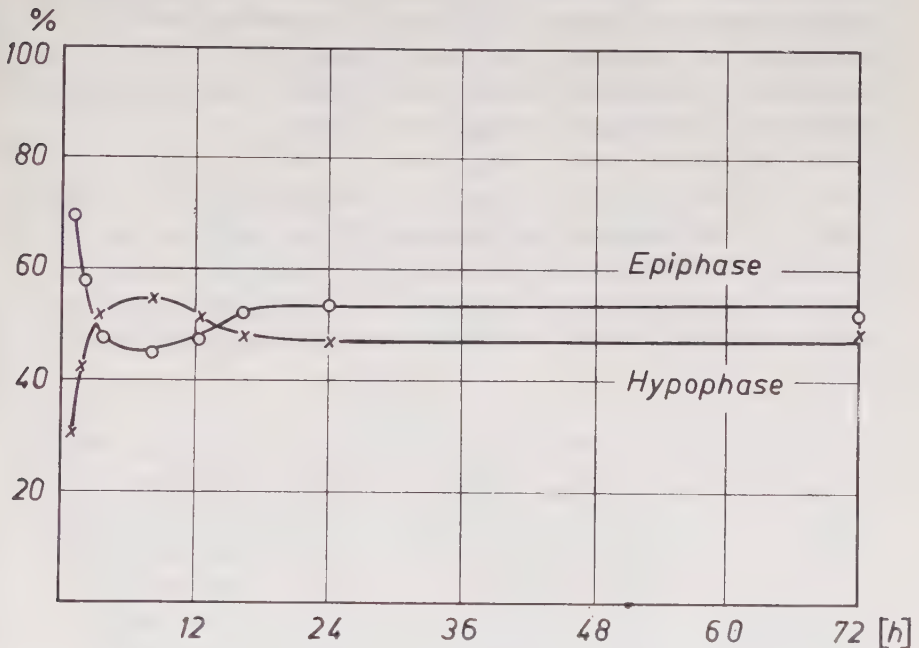


Abb. 18: Prozentuale Verteilung von Epi- und Hypophase bei Zugabe von Methylenblau und Glukose.
Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
Ordinate: Prozent des Gesamtfarbstoffes.

Quantitativ zeigte sich zunächst eine äußerst starke Förderung gegenüber den Werten mit Glukose oder Methylenblau allein (Abb. 14); es ergab sich also eine Summierung der fördernden Wirkung beider Substanzen.

Im Gegensatz zu den Werten mit Glukose allein nimmt der prozentuale Anteil der epiphasischen Carotinoide nach einer anfänglichen Abnahme wieder zu und zwar in so starkem Maße, daß er nach 15 Std. höher liegt als der Hypophasenanteil (Abb. 18). Die fördernden Wirkungen von Methylenblau und Glukose summieren sich demnach auch in Bezug auf die Epiphasen, denn sowohl Methylenblau als besonders auch Glukose förderten die Ausbildung der epiphasischen Carotinoide (vergl. Abb. 10 und 15).

Betrachtet man den Bildungsverlauf von Lycopin und γ -Carotin (Abb. 19), so ergeben sich gewisse Unterschiede zu den entsprechenden Werten bei alleiniger Glukosezugabe (vergl. Abb. 12). Während das γ -Carotin dort zwischen 8 und 12 Stunden abnimmt, zeigt sich hier nur eine Verflachung der Kurve.

Eine Erklärung wäre vielleicht folgende Annahme: Die Menge des γ -Carotins steigt zunächst in beiden Fällen an, sie beginnt aber ohne Methylenblau wieder abzunehmen, ehe die Wirkung der Glukose einsetzt, während mit Methylenblau sofort eine zunächst schwache, ab 12. Std. aber kräftige Steigerung der Farbstoffproduktion einsetzt. Man kann also annehmen, daß die Wirkung der Glukose durch eine Beteiligung von Methylenblau unterstützt wird, was sich einmal in einer stärkeren Farbstoffbildung überhaupt ausdrückt, andererseits sich aber auch darin zeigt, daß zwischen der 4. und 8. Stunde das γ -Carotin nicht abnimmt.

Unter den übrigen epiphasischen Fraktionen fällt vor allem die extreme Förderung der Zone 3 auf. Abb. 20 gibt einen

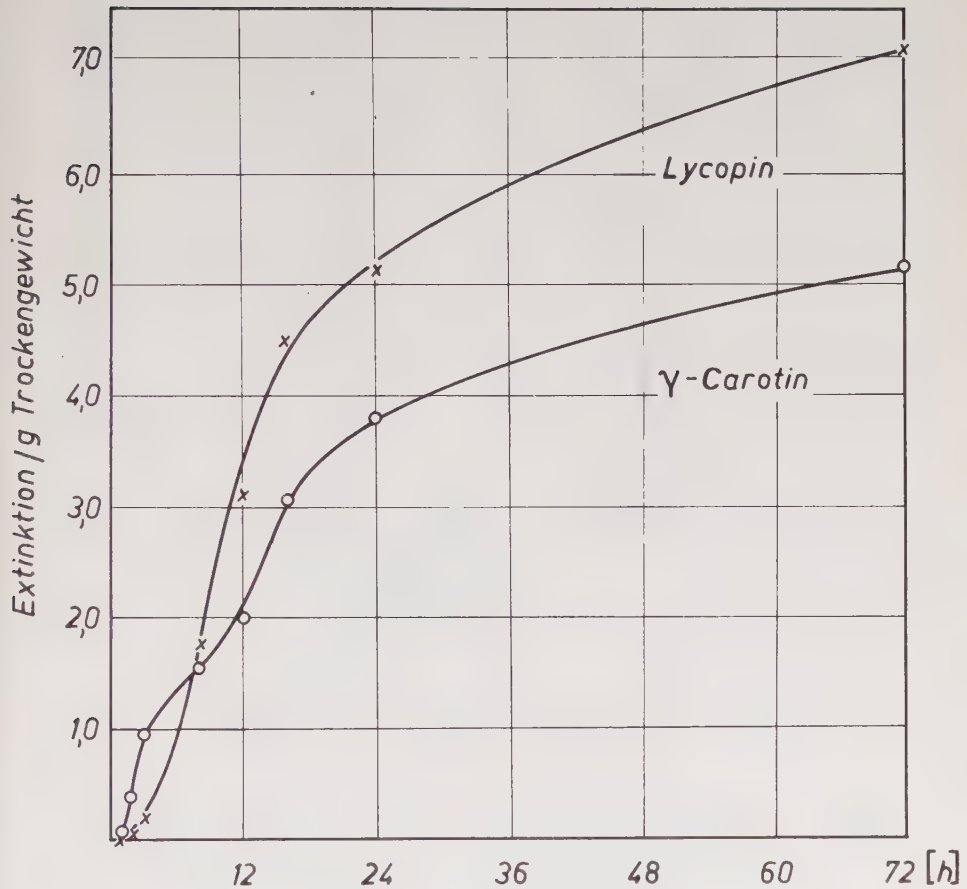


Abb. 19: Bildungsverlauf von Lycopodium und γ -Carotin bei Zugabe von Methylenblau + Glukose.
Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
Ordinate: Extinktion pro g Trockengewicht.

Vergleich dieser Zone bei den verschiedenen Versuchsbedingungen wieder; ihren Bildungsverlauf zeigt Abb. 21.

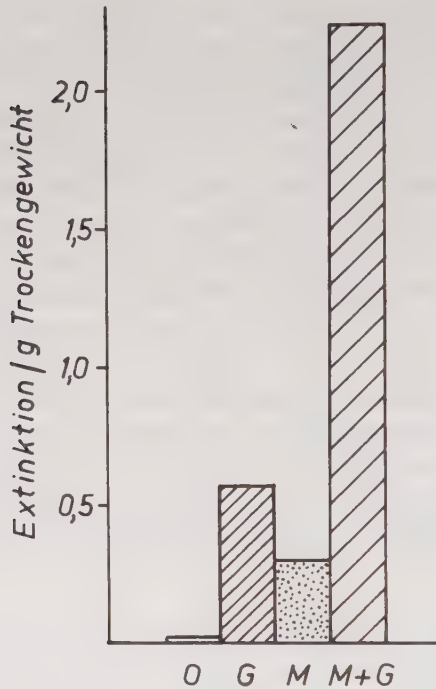


Abb. 20: Extinktion der Zone 3 unter verschiedenen Versuchsbedingungen.
Ordinate: Extinktion pro g Trockengewicht.

O = ohne Glukose
Gl = mit Glukose
M = mit Methylenblau
M+G = mit Methylenblau + Glukose

Die Zunahme erfolgt bis zu einer Belichtungszeit von etwa 24 Stunden praktisch linear.

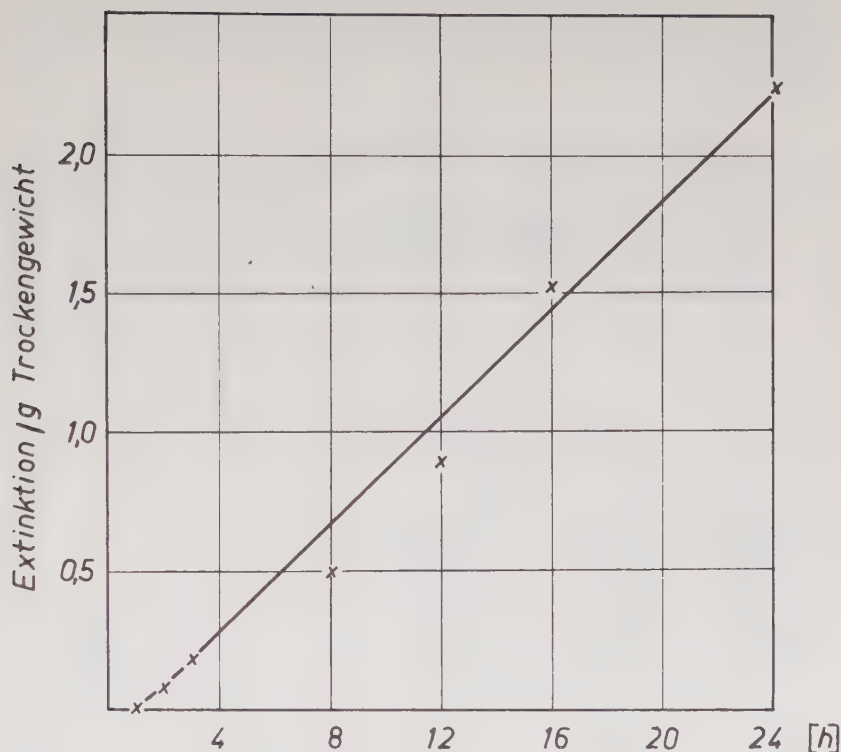


Abb. 21: Bildungsverlauf der Zone 3 in Gegenwart von Methylenblau + Glukose.

Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung;
Ordinate: Extinktion pro g Trockengewicht.

Abbildung 22 zeigt schließlich einen Vergleich der prozentualen Verteilung der Einzelfraktionen bei Zugabe von Methylenblau allein und in Verbindung mit Glukose.

Es ergeben sich sehr ähnliche Verhältnisse wie bei den Versuchen mit und ohne Glukose (Abb. 13); hier wie dort zeigen die Glukosewerte eine größere Ausgeglichenheit in ihrer prozentualen Verteilung. Ganz analog findet auch bei den Versuchen mit Methylenblau zwischen der 24. und 72.

Stunde keine wesentliche Änderung in der Pigmentzusammensetzung mehr statt.

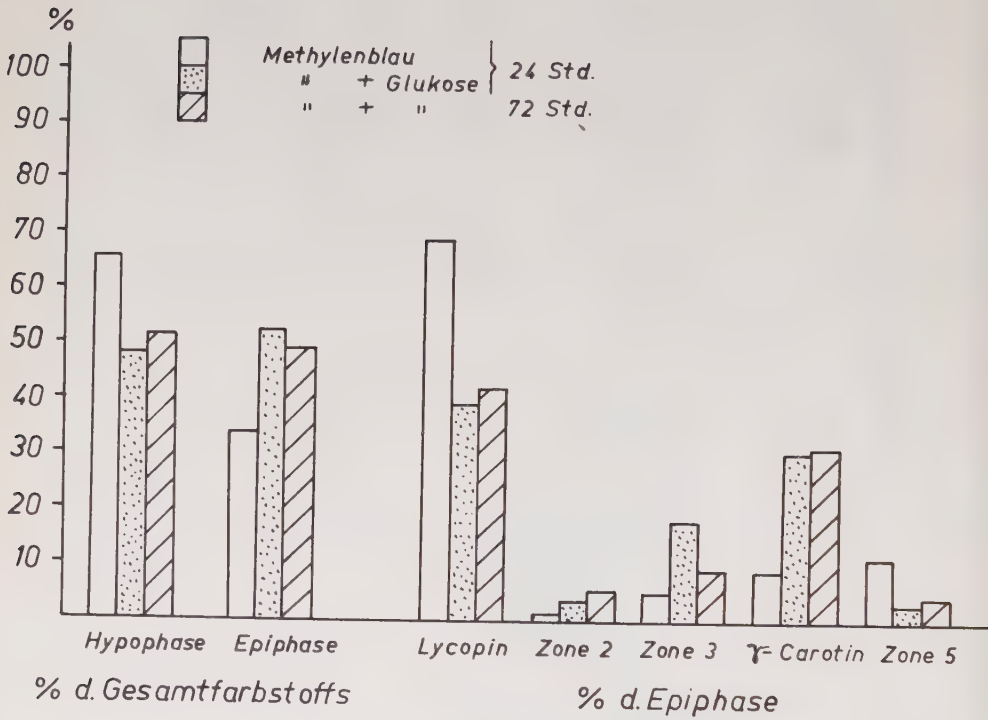


Abb. 22: Vergleich der prozentualen Verteilung der Carotinoidfraktionen bei Zugabe von Methylenblau mit und ohne Glukosezusatz.

IV. Diskussion

Betrachtet man die vorliegenden Versuchsergebnisse im Zusammenhang, so wird deutlich, daß diese mit dem PORTER-LINCOLN-Schema nicht im Einklang stehen. Wie bereits in der Einleitung dargestellt wurde, sieht dieses eine Bildung des γ -Carotins aus Lycopin vor. Die obigen Ergebnisse (vergl. Abb. 7a und 8) zeigen jedoch, daß in den ersten 6 Stunden, während derer die Menge des gebildeten γ -Carotins ihren Höchstwert erreicht, das Lycopin erst in verschwindend geringer Konzentration vorhanden ist. Die γ -Carotinmenge fällt dann von der 6. Stunde an stark ab; der Lycopingehalt nimmt dagegen um diese Zeit noch kräftig zu und erreicht erst nach 12 Stunden sein Maximum. Würde sich das γ -Carotin aus dem Lycopin bilden, wie es das Schema fordert, so müßte als erstes Carotinoid in größerer Menge Lycopin auftreten, und erst danach eine kräftige Synthese des γ -Carotins erfolgen. Die vorliegenden Ergebnisse lassen aber im Gegenteil auf eine Umwandlung des γ -Carotins und möglicherweise der Zone 3 in Lycopin schließen, sofern man den Grundgedanken des Porter-Lincoln-Schemas, nämlich die stufenweise Bildung eines Carotinoids aus dem anderen, als richtig annimmt. Eine mengenmäßige Überprüfung, die diese Annahme stützt, wurde schon in einem früheren Abschnitt angestellt.

Daß eine derartige Bildung von Lycopin durch Ringöffnung z.B. an einer β -Carotinmolekel möglich ist, fanden DECKER und UEHLEKE (1961). Mit Parenchym oder Homogenaten von Tomaten gelang ihnen die Bildung von Lycopin aus β -Carotin. Es wurde dabei die Möglichkeit diskutiert, ob die Lycopinsynthese in Tomaten über β -Carotin als Zwischenstufe läuft und ob letzteres auf einem anderen, am Lycopin vorbeiführenden Weg gebildet wird. Sie konnten allerdings auch

den umgekehrten Vorgang, nämlich eine Umwandlung von Lycopin-C¹⁴ in β -Carotin nachweisen und damit zeigen, daß der Ringschluß noch auf der Stufe des Lycopins und nicht nur bei stärker hydrierten Polyenen möglich ist.

Die an *Fusarium aquaeductuum* gewonnenen Ergebnisse sind nun aber nicht die ersten, die gegen die von PORTER und LINCOLN angenommene Reaktionsfolge Lycopin $\longrightarrow$ γ -Carotin sprechen. So fanden z.B. PURCELL, THOMPSON und BONNER (1959) bei ihren Versuchen an Tomaten folgende Verhältnisse: Während sich die Gesamtmengen von β -Carotin und Lycopin wie 1:5 verhielten, verteilte sich nach Inkubation mit markiertem Kohlenstoff dieser auf beide Verbindungen im Verhältnis 15:1, sodaß das entsprechende Verhältnis der spezifischen Aktivitäten 80:1 betrug; der Einbau erfolgt demnach bevorzugt in das β -Carotin. Diese Tatsache ist aber unvereinbar mit einer Bildung von β -Carotin aus Lycopin. Da auch kein zwingender Anhaltspunkt für die unabhängige Synthese von Lycopin und β -Carotin aus einer gemeinsamen Vorstufe vorlag, zogen die Autoren die Möglichkeit in Betracht, daß Lycopin in Tomaten aus β -Carotin - vermutlich über γ -Carotin - gebildet wird. Nach MASE (1959) sprechen wichtige Gründe gegen eine Bildung von β -Carotin durch Cyclisierung des Lycopins; u.a. führt er als Gegenargument die große thermodynamische Stabilität von Lycopin und eine deutliche sterische Verhinderung einer direkten Cyclisierung an.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Gegensatz zu den Befunden von GROB (1959) an *Neurospora crassa*, der Lycopin, neben γ -Carotin und Neurosporin, bereits nach 60 Min., γ -Carotin neben verschiedenen anderen Carotinoiden jedoch erst nach 6 Std. fand. In Anlehnung an das Schema von Porter und Lincoln zog GROB daher die Möglichkeit in Betracht, daß Lycopin durch Ringschluß in γ -Carotin umgewandelt wird.

Ebenfalls an *Neurospora* hatte ZALOKAR (1954) einen starken Anstieg des Lycopins nur bis zur 3. Stunde gefunden; ein ähnliches Verhalten zeigten } -Carotin und Neurosporin. Das } -Carotin nahm dagegen bis 24 Std. laufend zu. Aus der Tatsache, daß das } -Carotin nahezu linear zunimmt, die Lycopinmenge aber nicht gleichzeitig abnimmt, sondern von der 3. Std. an konstant bleibt, schließt ZALOKAR, im Gegensatz zu GROB, daß für diesen Fall das Porter-Lincoln-Schema nicht zutrifft, und nimmt deshalb eine parallele Bildung der einzelnen Carotinoide aus einer gemeinsamen Vorstufe an.

Um das unterschiedliche Verhalten von *Fusarium* und *Neurospora* zu veranschaulichen, sind in Tab. 4 die entsprechenden Lycopin- und } -Carotinmengen gegenübergestellt.

Std.	L y c o p i n		} - C a r o t i n	
	<i>Fusarium</i>	<i>Neurospora</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Neurospora</i>
1	0,03 mg	0,7 mg	0,1 mg	0,5 mg
2	0,04	1,6	0,4	1,0
3	0,15	1,8	1,1	1,3
4	0,3	1,8	1,2	1,5
6	0,9	1,8	1,3	2,2
8	1,4	1,8	0,9	1,8
12	2,3	-	0,6	3,9
24	2,7	-	0,35	6,8

Tab.4: Lycopin- und } -Carotingehalt von *Fusarium* und *Neurospora* (Werte für *Neurospora* nach ZALOKAR, 1954).

Zusammenfassend kann man also feststellen, daß der Grundgedanke der Porter-Lincoln-Hypothese, nämlich die stufenweise Dehydrierung des primär gebildeten C_{40} -Kohlenwasserstoffs zwar von den meisten Autoren angenommen wird, wie aber die

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, sowie der Arbeiten von DECKER und UEHLEKE (1961), PURCELL, THOMPSON und BONNER (1959), MASE (1959), GROB (1959) und ZALOKAR (1954) zeigen, herrscht noch keine Klarheit darüber in welcher Reihenfolge die einzelnen Carotinoide entstehen. Hinsichtlich des Ablaufs der Einzelreaktionen bestehen wohl außerdem auch noch artspezifische Unterschiede.

Wie schon bei anderen Organismen festgestellt werden konnte (siehe Einleitung), führt auch bei *Fusarium aquaeductum* die Zugabe von Glukose zu einer vermehrten Farbstoffproduktion. Diese Tatsache deutet daraufhin, daß der durch die Belichtung geschaffene "angeregte Zustand" (RAU, 1962) nicht vollständig zur Carotinoidbildung ausgenutzt werden kann, weil nicht genügend Vorstufen zur Verfügung stehen.

Es soll an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen werden, daß bei den vorliegenden Untersuchungen eine zusätzliche Plasmavermehrung des Pilzes dadurch ausgeschlossen wurde, daß keine Stickstoffverbindungen zugegeben wurden.

Die Ergebnisse bei Glukosezugabe scheinen die oben diskutierte Umwandlung von γ -Carotin in Lycopin zu bestätigen. Während sich bei den Versuchen ohne Glukose die Vorstufen nach einigen Stunden erschöpfen, sodaß für eine weitere Synthese das γ -Carotin teilweise verbraucht werden muß (Abb. 7a und 8), können hier neue Vorstufen aus der zugeführten Glukose gebildet werden und die Synthese aller Komponenten kann in $\pm$ starkem Maße weiterlaufen (Abb. 12 und 13).

Die Frage, in welcher Weise die Glukose als Kohlenstoff-Quelle für die Carotinoidbildung verwendet wird, wurde in neuerer Zeit von GROB, BÜTLER und GRUNDBACHER (1955) untersucht. Sie stellten an *Mucor hiemalis* fest, daß eine Farbstoffsynthese bei Verwendung von Glukose als Kohlenstoffquelle nur

dann möglich war, wenn daraus Brenztraubensäure gebildet werden konnte. War die Brenztraubensäurebildung gehemmt (z.B. durch Zugabe von NaF) so hatte dies auch eine Hemmung der Carotinoidbildung zur Folge. Die Versuche beweisen, daß die Brenztraubensäure, die beim Kohlenhydratabbau im Organismus als Zwischenprodukt entsteht, als Vorstufe über Essigsäure bzw. Azetyl Coenzym A zur Pigmentsynthese dient.

Aus den vorliegenden Ergebnissen geht nun aber hervor, daß an der gesteigerten Farbstoffbildung nicht alle Komponenten gleichmäßig beteiligt sind, sondern daß einige Carotinoide (vor allem die epiphasischen) im Verhältnis stärker gefördert werden. Eine ähnliche Veränderung der Pigmentzusammensetzung fanden STARR und SAPERSTEIN (zit. bei MACKINNEY, 1952). Ihre Untersuchungen an *Corynebacterium poinsettiae* ergaben bei niedrigerer Thiaminkonzentration rosa gefärbte Kulturen mit vorwiegend Spirilloxanthin und Lycoxanthin, während höhere Thiaminkonzentration die Bildung oranger Kolonien verursacht, welche sich durch reduzierten Spirilloxanthin- und unveränderten Lycoxanthingehalt, sowie durch das neu hinzutretende Cryptoxanthin auszeichneten. Die Autoren vermuten, daß Thiamin aktiv beim Ringschluß des offenkettigen Typs (Lycoxanthin) zum geschlossenen (Cryptoxanthin) mitwirkt. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von GOODWIN und LIJNSKY (1951) bei *Phycomyces*. Hier zeigte sich, daß Änderungen in den Kulturbedingungen sowohl die β -Carotinproduktion als auch die der übrigen Komponenten im gleichen Maße beeinflussten; eine vermehrte β -Carotinsynthese fand nicht auf Kosten anderer Polyenkomponenten statt.

Auf welche Weise Glukosezugabe die Bildung der einzelnen Carotinoide in verschiedenem Ausmaß fördert, kann nach den obigen Versuchsergebnissen nicht entschieden werden.

Wie die Versuche mit Methylenblau gezeigt haben, wird in Gegenwart dieses Farbstoffes die Carotinoidbildung sowohl mit als auch ohne Glukose gefördert; bei gleichzeitiger Anwesenheit von Methylenblau und Glukose ist die Wirkung additiv.

Methylenblau ist als unbiologischer, aber der Zelle zuträglicher Farbstoff bekannt. Er ist außerdem ein autoxydabler Redoxkörper und vermag sich als Wasserstoff-Überträger zwischen Flavinenzym und molekularem Sauerstoff einzuschalten. So deuten z.B. Befunde von SCHLEGEL (1953) an *Hydrogenomonas* daraufhin, daß Methylenblau den gesamten Wasserstofftransport auf unbiologischem Wege vermitteln kann; dabei kann es die Cyanidhemmung der Atmung überbrücken. HARROP und BARRON (1932) stellten fest, daß die katalytische Wirkung von Methylenblau auf die Sauerstoff-Aufnahme von Seetieren durch steigende Mengen von KCN nicht beeinflusst wird. Seit THUNBERG (1920, zit. bei BARTHA, 1962) wird Methylenblau als Wasserstoff-Acceptor zur Messung von Dehydrierungsprozessen herangezogen. WARBURG und CHRISTIAN (zit. bei SCHLEGEL, 1953) stellten nach der Isolierung des "gelben Ferments" (1932) folgende Gleichung auf :

$$\text{Methylenblau} + \text{Leukoferment} = \text{Leuko-Methylenblau} + \text{gelbes Ferment}$$

BARTHA (1962) zeigte durch Versuche mit *Hydrogenomonas*-Stämmen, daß Methylenblau dort einen ausgesprochenen Entkoppelungseffekt hat. Es wirkt als Elektronenüberträger und beschleunigt die Wasserstoff-Oxydation, verhindert aber die CO_2 -Fixierung.

Welche Rolle das Methylenblau bei der Carotinoidsynthese von *Fusarium* spielt kann nach den vorliegenden Versuchsergebnissen noch nicht erklärt werden. Zu denken wäre an 2 Möglichkeiten: Methylenblau wirkt als zusätzlicher Lichtacceptor oder aber es greift durch seine Fähigkeit reversibel (H) aufzunehmen, direkt in den Syntheseweg ein.

V. Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit wurde bei *Fusarium aquaeductuum* der Verlauf der Carotinoidbildung untersucht. Dabei wurde die Veränderung der quantitativen Zusammensetzung des Pigmentgemisches sowie deren Beeinflussung durch das Substrat geprüft, um daraus Rückschlüsse auf den Syntheseweg der Carotinoide ziehen zu können.
2. Pilzsuspensionen wurden in Gaswaschflaschen unter ständiger Belüftung zur Farbstoffbildung dem Licht ausgesetzt; nach entsprechenden Zeiten wurden die Pigmente extrahiert und ihre Gesamtmenge sowie ihr Gehalt an epi- und hypophasischen Komponenten durch Absorptionsmessung bestimmt.
3. Zur Auftrennung der epiphasischen Carotinoide wurde die von E. STAHL entwickelte Dünnschicht-Chromatographie für die speziellen Bedürfnisse dieser Analysen umgearbeitet. Als günstigstes Adsorptionsmittel erwies sich Kieselgel G (Merck) und als Entwickler ein Gemisch aus 85 % Petroläther und 15 % Benzol.
4. Die mit Hilfe dieser Methode aufgetrennten epiphasischen Carotinoide wurden identifiziert und quantitativ bestimmt; dabei konnte ein für *Fusarium aquaeductuum* bisher noch nicht bekanntes Carotinoid näher charakterisiert werden (Abb. 4, Zone 5).
5. Bereits nach 1-stündiger Belichtung sind sämtliche Komponenten des Farbstoffgemisches vorhanden. In den ersten Stunden überwiegt allerdings noch das β -Carotin; etwa von der 5. Stunde an nimmt seine Menge jedoch mit der

verstärkt einsetzenden Bildung von Lycopin und Neurosporaxanthin wieder ab. Ähnlich verhält sich eine nicht identifizierte Fraktion (Zone 3), deren Abnahme nach etwa 8 Stunden einsetzt.

6. Die Pigmentzusammensetzung ist unabhängig von der Intensität des zur Induktion der Farbstoffbildung eingestrahltten Lichtes.
7. Zugabe von Glukose zum Substrat führt nicht nur zu einer Steigerung der Pigmentsynthese im allgemeinen, sondern verändert auch deren Verlauf und die Zusammensetzung des Farbstoffgemisches. Die Bildung der epiphasischen Carotinoide wird dabei stärker gefördert als die des Neurosporaxanthins.
8. Ein Zusatz von Methylenblau führt ähnlich wie der von Glukose zu einer vermehrten Farbstoffproduktion; eine prozentual stärkere Förderung erfahren dabei die Zonen 3 und 5 der Epiphase. Bei gleichzeitiger Zugabe von Glukose und Methylenblau konnte eine additive Wirkung festgestellt werden.
9. Auf Grund der Versuchsergebnisse wird die Möglichkeit einer Bildung von Lycopin aus γ -Carotin diskutiert und mit dem Porter-Lincoln Schema verglichen.

VI. L i t e r a t u r

- BARTHA, R.: Physiologische Untersuchungen über den chemo-lithotropen Stoffwechsel neu isolierter Hydrogenomonas Stämme. Arch.Mikrobiol. 41, 313-350 (1962).
- BEEKMANN, H.: Über den Umsatz von Carotinoiden in höheren Pflanzen. Naturw. 40, 486-487 (1953).
- CARLILE, M.J.: A Study of the Factors influencing Non-genetic Variation in a Strain of Fusarium oxysporum. J.gen.Mikrobiol. 14, 643-654 (1956).
- CLAES, H.: Biosynthese von Carotinoiden bei Chlorella Tetrahydrolycopin und Lycopin. Zeitschr.f. Naturf. 11b, 260-266 (1956).
- CLAES, H.: Biosynthese von Carotinoiden bei Chlorella Untersuchungen über die lichtabhängige Synthese von α - und β -Carotin und Xanthophyllen bei der Chlorella Mutante 5/520. Zeitschr.f.Naturf. 12b, 401-407 (1957).
- EBERHARD, D.: Über die Lichtabhängigkeit der Farbstoffbildung von Fusarium aquaeductum. Zulassungsarbeit München (1962).
- EBERHARD, D., W.RAU und C. ZEHENDER: Über den Einfluß des Lichts auf die Carotinoidbildung von Fusarium aquaeductum. Planta 56, 302-308 (1961).
- ENY, D.M.: Colorless Polyenes in Green Leaves and Latex. Arch.Biochem. 46, 18-21 (1953).

- FROMAGEOT, C. und J.L. TSCHANG: Sur les Pigments Carotenoides de *Rhodotorula Sanniei*. Arch.Mikrobiol. 9, 424-433 (1938).
- FROMAGEOT, C. und J.L. TSCHANG: Sur la Synthese des Pigments Carotenoides par *Rhodotorula Sanniei*. Arch. Mikrobiol. 9, 434-448 (1938).
- GARTON, G.A., T.W. GOODWIN and W. LIJNSKY: General Conditions governing β -Carotene Synthesis by the fungus *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. Biochem.J. 48, 154-163 (1951).
- GOODWIN, T.W. and W.LIJNSKY: Carotene Production by *Phycomyces blakesleeanus*. Biochem.J. 50, 268-273 (1951).
- GOODWIN, T.W.: Identification of the Minor Polyene components of the Fungus *Phycomyces blakesleeanus* and a Study of their Synthesis under various cultur Conditions. Biochem. J. 50, 550-558 (1952).
- GOODWIN, T.W. and J.S. WILLMER: Nitrogen Metabolism and Carotene Synthesis in *Phycomyces blakesleeanus*. Biochem. J. 51, 213-217 (1952).
- GOODWIN, T.W.: Carotenoids. In Modern Methods of Plant Analysis. Peach Tracey III, 272-311, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955.
- GOODWIN, T.W.: Carotenoids. Annual Review of Biochem., 24, 497-522 (1955).
- GOODWIN, T.W. and M.JAMIKORN: The Carotenoids produced by different strains of *Mycobacterium phlei*. Biochem.J. 62, 269-275 (1956).
- GOODWIN, T.W.: Carotenoid production by strongly chromogenic Bacterium isolated from Butter. Biochem.J. 62, 275-281 (1956).

- GOODWIN, T.W. and D.G. LAND: Carotenoids of some species of *Chlorobium*. *Biochem.J.* 62, 553-556 (1956).
- GOODWIN, T.W.: Carotenoids. In *Handbuch der Pflanzenphysiologie* X, 186-222. Berlin-Göttingen-Heidelberg (1958).
- GOODWIN, T.W.: Biosynthesis and function of Carotenoids. *Annual Review of Plant Physiol.* 12, 219-244 (1961).
- GROB, E.C.: Über die Biosynthese der Carotinoide bei *Mucor hiemalis*. *Chimia (Aarau)* 7, 90-91 (1953).
- GROB, E.C., R. BÜTLER und V. GRUNDBACHER: Die Stellung der Brenztraubensäure in der Biosynthese der Carotinoide. *Helvetica Chimica Acta* XXXIX, 168-173 (1955).
- GROB, E.C. und R. BÜTLER: Über einen möglichen Weg der Biosynthese der Carotinoide bei *Mucor hiemalis*. *Experientia* XI, 259-261 (1955).
- GROB, E.C.: Über die Biosynthese der Carotinoide bei einigen Mikroorganismen. *Chimia (Aarau)*, 10, 73-80 (1956).
- GROB, E.C.: Über die Bildung der Carotinoide bei *Neurospora crassa*. *Chimia (Aarau)* 12, 86-88 (1958).
- GROB, E.C.: The Biosynthesis of Carotenoids by Micro-Organisms. *Ciba Foundation Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Sterols*. 267-276 (1959).
- GROB, E.C., K.KIRCHNER und F. LYNEN: Neues über die Biosynthese der Carotinoide. *Chimia (Aarau)*, 15, 308-310 (1961).

- GROB, E.C., W.EICHENBERGER und R.P. PFLUGSHAUPT: Zur Bildung der Carotinoide in Blättern, Blüten und Früchten. *Chimia* (Aarau) 15, 565-566 (1961).
- GROB, E.C. und A. BOSCHETTI: Über das natürliche Vorkommen von Lycopersen in *Neurospora crassa*. *Chimia* (Aarau) 16, 15-16 (1962).
- HAXO, F.: Studies on the Carotenoid pigments of *Neurospora*. 1. Composition of the Pigment. *Arch.Biochem.* 20, 400-421 (1949).
- KARRER, P. und E. JUCKER: Carotinoide. Verlag Birkhäuser, Basel 1948.
- KRZEMINSKI, L.F. and F.W.QUACKENBUSH: Stimulation of Carotene Synthesis in submerged Cultures of *Neurospora crassa* by Surface-active Agents and Ammonium Nitrate. *Arch.Biochem.Biophys.* 88, 64-67 (1960).
- KRZEMINSKI, L.F. and F.W.QUACKENBUSH: Incorporation of C¹⁴-labeled Compounds into Carotenes by *Neurospora crassa*. *Arch.Biochem.Biophys.* 88, 287-293 (1960).
- LYNEN, F.: Zur Biosynthese der Terpene III. *Angewandte Chemie* 70, 738-742 (1958).
- MACKINNEY, G.: Carotenoids. *Annual Review of Biochem.* 21, 473-492 (1952).
- MASE, J.: Biosynthesis of Carotenoids by Fungi. *J.of Vitaminology* 5, 161-177 (1959).
- MODI, V.V. and D.K. PATWA: Occurrence of Mevalonic Acid in Carrots. *Nature* 191, 1202 (1961).
- NIEL, C.B. van, T.W. GOODWIN and M.E.SISSINS: The Nature of the Changes in Carotenoid Synthesis in *Rhodospirillum rubrum* during growth. *Biochem.J.* 63, 408-412 (1956).

- PORTER, J.W. and R.E. LINCOLN: Lycopersicon selection containing a high content of Carotenes and colorless Polyenes II. The mechanism of Carotene Biosynthesis. Arch.Biochem. 27, 390-403 (1950).
- PURCELL, A.E., G.A. THOMPSON Jr. and J. BONNER: The incorporation of Mevalonic Acid into Tomato Carotenoids. J.biol.Chem. 234, 1081-1084 (1959).
- PURCELL, A.E. and G.A. THOMPSON Jr.: Glucose as a Carbon Source for Carotene Synthesis in Tomatoes. Arch.Biochem. Biophys. 93, 231-237 (1961).
- RAU, W. und C.ZEHENDER: Die Carotinoide von Fusarium aquaeductum Lagh. Arch.Mikrobiol. 32, 423-428 (1959).
- RAU, W.: Untersuchungen über den Ablauf der lichtabhängigen Carotinoidbildung bei verschiedenen Temperaturen. Habilitationsschrift, München (1962).
- RINNER, G.: Untersuchungen über die Lichtsättigung und den Atmungsverlauf bei Carotinoidbildung. Zulassungsarbeit, München (1962).
- SUZUE, G.: Enzymic synthesis of bacterical Phytoene from 2-C¹⁴Mevalonic Acid. Biochim.Biophys.Acta 45, 616-617 (1960).
- SUZUE, G.: Enzymic conversion of bacterial Phytoen from Bacteria in $\int$ -Caroten. Biochim.Biophys.Acta 50, 593-594 (1961).
- SCHLEGEL, H.G.: Physiologische Untersuchungen an wasserstoffoxydierenden Bakterien. Arch.Mikrobiol. 18, 362-390 (1953).
- SCHLEGEL, H.G.: Myxoxanthophyll als Hauptcarotinoid von Mycobacterium phlei. Arch.Mikrobiol. 31, 231-239 (1958).

- SCHOPFER, W.H. et E.C. GROB: Recherches sur la biosynthese des carotenoides chez un Microorganisme. *Experientia* 6, 419-421 (1950).
- SCHUB, M.: Zulassungsarbeit (in Vorbereitung) München.
- STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie. III. Mitteilung. *Parfümerie und Kosmetik* 9 (1958).
- STAHL, E.: Zur Inaktivierung der Pyrethrine am Wirkungs-ort. *Arch.d.Pharmazie* 293/65, 531-537 (1960).
- VILLOUTREIX, J.: Sur les Carotenoides d'une levure rouge: *Rhodotorula mucilaginosa*. These Universite de Nancy. Faculte des Sciences (1960).
- YOKOYAMA, H., T.O.M. NAKAYAMA and C.O. CHICHESTER: Biosynthesis of β -Carotene by Cell free extracts of *Phycomyces blakesleeanus*. *J.biol.Chem.* 237, 681-686 (1962).
- ZALOKAR, M.: Studies on Biosynthesis of Carotenoids in *Neurospora crassa*. *Arch.Biochem.Biophys.* 50, 71-80 (1954).
- ZALOKAR, M.: Biosynthesis of Carotenoids in *Neurospora*. Action Spectrum of Photoactivation. *Arch. Biochem. Biophys.* 70, 318-325 (1955).
- ZALOKAR, M.: Variation in the Production of Carotenoids in *Neurospora*. *Arch.Biochem.Biophys.* 70, 561-567 (1957).
- ZALOKAR, M.: Isolation of an Acidic Pigment in *Neurospora*. *Arch.Biochem.Biophys.* 70, 568-571 (1957).

Lebenslauf

Am 9. August 1935 wurde ich, Ursula Böhme, als Tochter des Kunstmalers Hans Böhme und seiner Ehefrau Maria, geb. Bauer, in Rothenburg ob der Tauber geboren. Von 1941-1946 besuchte ich die Volksschule in Rothenburg und trat im September 1946 dort in die Oberrealschule ein, die ich im Juli 1954 mit der Reifeprüfung abschloß. Im Wintersemester 1954/55 immatrikulierte ich mich an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München. 1960 bestand ich das Staatsexamen für das Lehramt an Höheren Schulen und arbeitete seit dieser Zeit unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Brauner an meiner Dissertation.

